



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Mecanismos de progresión y transformación en linfomas de células B de bajo grado:

Alteraciones citogenéticas y moleculares

Daniel Martínez Hernández



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

TESIS DOCTORAL

MECANISMOS DE PROGRESIÓN Y TRANSFORMACIÓN EN LINFOMAS DE CÉLULAS B DE BAJO GRADO: Alteraciones citogenéticas y moleculares

Doctorando: Daniel Martínez Hernández

Tutor y director de tesis: Antonio Martínez Pozo

Director de tesis: Elias Campo

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

.1 CLASIFICACIÓN DE LOS LINFOMAS B

.1.1 Leucemia linfática crónica (CLL)

.1.1.1 Generalidades de la leucemia linfática crónica

.1.1.2 Valor de la biopsia ganglionar en el seguimiento del paciente con CLL

.1.1.3 Patogénesis molecular de la CLL

.1.2 Linfoma Folicular (FL)

.1.2.1 Generalidades del linfoma folicular

.1.2.2 Valor de la biopsia ganglionar en el diagnóstico del FL

.1.2.3 Patogénesis molecular del FL

.1.3 Linfoma esplénico difuso de la pulpa roja (SDRPL)

.1.3.1 Generalidades del linfoma esplénico difuso de la pulpa roja

.2 MECANISMOS DE TRANSFORMACIÓN Y PROGRESIÓN DE LOS LINFOMAS DE BAJO GRADO

.2.1 Mecanismos de transformación en CLL

.2.2 Mecanismos de transformación en FL

.2.3 Impacto de *MYC* en la progresión y/o transformación

.2.4 Impacto de las mutaciones de *NOTCH* en la progresión y/o transformación

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

OBJETIVOS

III. RESULTADOS

PRIMER TRABAJO

SEGUNDO TRABAJO

TERCER TRABAJO

IV. DISCUSIÓN

V. CONCLUSIONES

VI. BIBLIOGRAFÍA

ACRÓNIMOS

BCR: Receptor de células B (del inglés *B-cell receptor*)

CLL: Leucemia linfática crónica (del inglés, *Chronic Lymphocytic Leukemia*)

DLBCL: Linfoma difuso de células grandes B (del inglés, *Diffuse Large B-cell Lymphoma*)

DNA: Ácido desoxiribonucleico (del inglés *Deoxyribonucleic Acid*)

VEB: Virus de Epstein-Barr

FL: Linfoma folicular (del inglés, *Follicular Lymphoma*)

IGHV: Gen de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (del inglés *Immunoglobulin Heavy chain Variable region gene*)

LDH: Lactato deshidrogenasa

SDRPL: Linfoma esplénico difuso de la pulpa roja (del inglés *Splenic Diffuse Red Pulp Small B-cell Lymphoma*)

SR: Síndrome de Richter

SMZL: Linfoma esplénico de la zona marginal (del inglés, *Splenic Marginal Zone Lymphoma*)

WHO: Organización Mundial de la Salud (del inglés, *World Health Organization*)

INTRODUCCIÓN

1.- CLASIFICACIÓN DE LOS LINFOMAS B

Los linfomas no-Hodgkin consisten en un grupo heterogéneo de neoplasias malignas que derivan de células linfoides progenitoras o de linfocitos B, T o células natural killer en diferentes estadios de diferenciación.

La presentación clínica de los linfomas varía enormemente dependiendo del tipo de linfoma o de las áreas anatómicas afectadas. Algunos linfomas se comportan de manera indolente y los pacientes manifiestan adenopatías que aparecen y se desvanecen a lo largo de los años. Por el contrario, otros linfomas son muy agresivos, requieren tratamiento intensivo y pueden resultar fatales en semanas. Los linfomas indolentes suelen presentarse de manera insidiosa, en forma de adenopatías de crecimiento lento, hepatomegalia, esplenomegalia y/o citopenias. Los linfomas agresivos, sin embargo, se presentan de forma aguda o subaguda, en forma de masas que crecen rápidamente, sintomatología sistémica (fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso) y frecuentemente se documentan niveles elevados de lactato deshidrogenasa sérica (LDH) y ácido úrico.

Los linfomas de células B son un grupo de neoplasias que tienden a imitar los estadios madurativos de la diferenciación de la célula B normal, y de hecho, la semejanza entre células linfomatosas y normales es la base para su clasificación y nomenclatura. Las leucemias/linfomas linfoblásticas B son neoplasias que derivan de linfoblastos inmaduros comprometidos a linaje de célula B, que tienen reordenamiento del gen IGH aunque no expresan inmunoglobulinas en su membrana y son TdT positivos. Las células B precursoras se originan de una célula madre en la médula ósea y, la mayoría de pacientes con estas neoplasias, manifiestan afectación de la médula ósea y tienen expresión leucémica. En cambio, los linfomas de células B maduras se originan en células B que han ya han abandonado el nicho de la médula ósea y poseen inmunoglobulinas de superficie y un receptor de inmunoglobulinas (BCR) funcional. Estos tumores pueden derivar de la expansión de un linfocito B en cualquier estadio madurativo, e incluye células naíf (vírgenes), células de

centro germinal, de memoria o postgerminales y células plasmáticas. Las neoplasias más frecuentes derivan de células que han experimentado una reacción en el centro germinal, que se inicia cuando una célula B estimulada por un antígeno migra desde la periferia hacia el centro germinal del folículo linfoide de los órganos linfoides secundarios, como los ganglios linfáticos, el bazo o el tejido linfoide asociado a mucosas. Las células B del centro germinal proliferan y experimentan dos eventos que permiten la diversificación de los genes de las inmunoglobulinas, que son la hipermutación somática y el cambio de clase de la cadena pesada. Muchos de los linfomas de células B maduras, incluyendo las neoplasias de células plasmáticas, muestran evidencias de hipermutación somática, y se cree que los “errores” que ocurren durante la hipermutación somática y el cambio de clase pueden ser responsables de muchas de las mutaciones y alteraciones de oncogenes que conllevan a la transformación neoplásica de las células B (Figura 1).^{1,2}

Las diversas entidades derivadas de la proliferación clonal de células B maduras incluyen neoplasias que se originan de células B naïf que todavía no han transitado por el centro germinal como el linfoma de células del manto y un subgrupo de leucemia linfática crónica (CLL), mientras que otros tumores posiblemente se originan de células durante su reacción a un antígeno dentro del centro germinal, como la CLL, el linfoma folicular (FL), el linfoma de Burkitt (LB) y el linfoma difuso de células grandes B (DLBCL). Finalmente se hallan los tumores que se originan en células postcentro germinal y que se han convertido en células de memoria como el linfoma linfoplasmocítico, el linfoma de la zona marginal y las neoplasias de células plasmáticas.^{1,3,4}

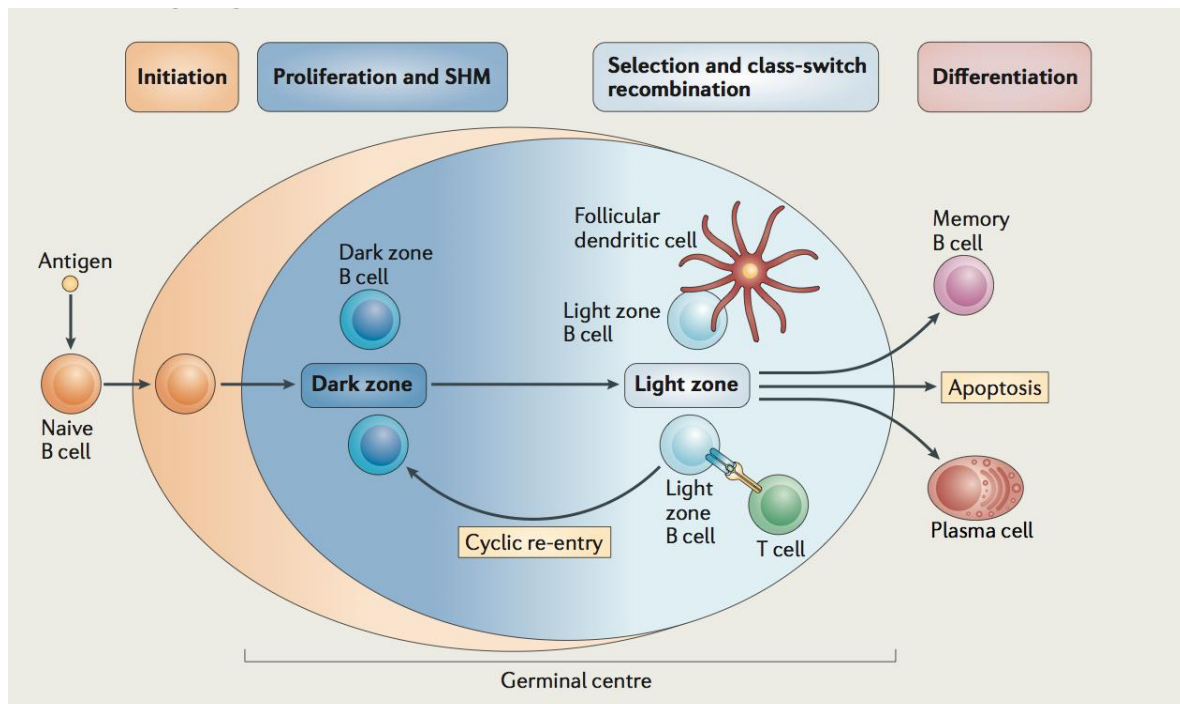


FIGURA 1: Diferenciación celular y procesos que ocurren en el centro germinal. Adaptación de Basso et al, 2015.

La clasificación de las neoplasias linfoides se basa en la segregación de entidades clínico-patológicas no solapadas con un sentido biológico permitiendo agrupar a pacientes dentro de una entidad que posee una etiopatogenia, pronóstico y tratamientos similares. Esta clasificación incorpora las características clínicas, la morfología, el inmunofenotipo y las alteraciones genéticas (Tabla 1).

Muchas de las neoplasias de células B maduras tienen alteraciones cromosómicas estructurales características y en los últimos años se han identificado mutaciones genéticas recurrentes que han ampliado nuestro conocimiento de las alteraciones moleculares y las vías oncogénicas implicadas en el desarrollo de este tipo de tumores.

La era del genoma humano ha supuesto un avance fundamental en el campo de la genética de los linfomas, lo que ha permitido pasar de una aproximación de un gen candidato, a visiones más globales de genomas y transcriptomas. Este cambio ha sido posible gracias al desarrollo de metodologías

experimentales y analíticas cada vez más potentes, que han proporcionado información molecular relevante en diferentes neoplasias linfoides.⁵⁻¹³

Tabla 1: Clasificación de las neoplasias de linaje B
(World Health Organization Classification of Tumours, 2008)

Neoplasias de precursores B

- Leucemia/Linfoma linfoblástico B, NOS
- Leucemia/Linfoma linfoblástico B, con alteraciones genéticas recurrentes

Neoplasias de células B maduras

- Leucemia linfática crónica/Linfoma linfocítico
- Leucemia prolinfocítica B
- Linfoma esplénico de la zona marginal
- Tricoleucemia
- Linfoma/Leucemia esplénico, no clasificable
- Linfoma linfoplasmacítico
- Enfermedad de cadenas pesadas
- Neoplasias de células plasmáticas
- Linfoma de la zona marginal, extranodal (MALT)
- Linfoma de la zona marginal, nodal
- Linfoma Folicular
- Linfoma primario cutáneo de centro folicular
- Linfoma de células del manto
- Linfoma difuso de células grandes B, NOS
- Linfoma de células grandes B, rico en linfocitos T e histiocitos
- Linfoma difuso de células grandes B primario del sistema nervioso central
- Linfoma difuso de células grandes B primario cutáneo, de tipo pierna
- Linfoma difuso de células grandes B asociado a la edad, EBV positivo
- Linfoma difuso de células grandes B asociado a inflamación crónica
- Granulomatosis linfomatoide
- Linfoma de células grandes B primario mediastínico
- Linfoma de células grandes B intravascular
- Linfoma de células grandes B ALK positivo
- Linfoma plasmablastico
- Linfoma de células grandes B originado en enfermedad de Castleman multicéntrica asociada a HHV8
- Linfoma primario de cavidades
- Linfoma de Burkitt
- Linfoma de células B, no clasificable, con rasgos intermedios entre linfoma difuso de células grandes B y linfoma de Burkitt
- Linfoma de células B, no clasificable, con rasgos intermedios entre linfoma difuso de células grandes B y linfoma de Hodgkin clásico

Desde un punto de vista patogenético estos progresos han contribuido a la comprensión de la complejidad de las bases genéticas de la linfomagénesis y han proporcionado una visión de las vías moleculares implicadas en los tumores, previamente desconocidas. Desde un punto de vista clínico, estos estudios han creado nuevos paradigmas para abordar las necesidades clínicas actualmente no cubiertas en el manejo de los pacientes con linfomas, proporcionando nuevos biomarcadores que permiten mayor precisión diagnóstica y nuevas dianas moleculares para el desarrollo y uso de fármacos más selectivos.¹⁴

1.1 Leucemia Linfática Crónica

1.1.1 Generalidades de la leucemia linfática crónica

La leucemia linfática crónica (CLL o linfoma linfocítico) es un síndrome linfoproliferativo B caracterizado por la proliferación y acumulación de linfocitos B maduros clonales CD5 positivos en la sangre, médula ósea y tejidos linfoides. Estas células presentan un inmunofenotipo específico, caracterizado por unos niveles bajos de inmunoglobulina de membrana y de otros antígenos vinculados a los linfocitos B. La CLL es el tipo de leucemia más frecuente en los países occidentales, con un pico máximo a los 65 años.

El diagnóstico de CLL requiere la presencia de al menos 5000 linfocitos B clonales por mililitro en sangre periférica mantenidos durante al menos tres meses. La clonalidad de los linfocitos B circulantes debe ser confirmada por citometría de flujo. Las células leucémicas de la CLL son linfocitos maduros de tamaño pequeño con citoplasma escaso bien definido y un núcleo con cromatina parcialmente agregada sin nucléolo evidente. Estas células pueden encontrarse mezcladas con células más grandes, células atípicas o prolinfocitos. Frecuentemente también se encuentran sombras de Gumprecht, que corresponden a restos celulares desvitalizados.¹⁵ (Figura 2).

El inmunofenotipo en sangre periférica demuestra que las células de CLL coexpresan el antígeno T CD5, los antígenos B de superficie CD19, CD20, CD22 y CD79b, y CD23. Cada clon de células leucémicas muestra restricción de cadena ligera de inmunoglobulinas kappa o lambda.¹⁵

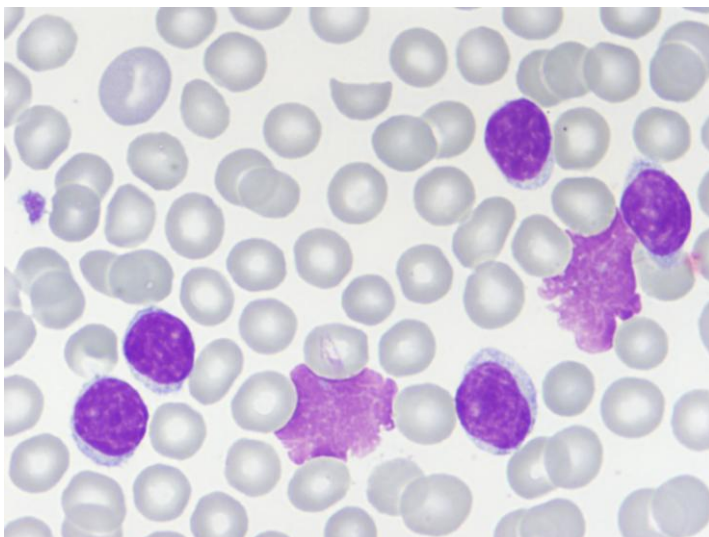


FIGURA 2: CLL en sangre periférica. Los linfocitos en la CLL son pequeños, con un núcleo de contorno regular y con cromatina cuarteada. Son frecuentes las sombras celulares.

Desde una perspectiva clínica, la CLL es una enfermedad que se comporta de forma muy heterogénea. Muchos de estos pacientes están asintomáticos en el momento del diagnóstico y, a lo largo de los años, pueden tener un curso clínico muy indolente, o por el contrario pueden progresar y requerir de una intervención terapéutica activa. Los estadios clínicos de Rai y Binet basados en parámetros que no se relacionan con la biología de la enfermedad han permitido definir su pronóstico, y continúan siendo vigentes. Estos parámetros incluyen una simple exploración física y los datos analíticos básicos. Sin embargo, no permiten predecir la probabilidad de progresar y requerir tratamiento en aquellos pacientes que manifiestan un estadio inicial de la enfermedad.¹⁶

Por este motivo, la identificación de nuevos factores pronósticos biológicos ha sido de utilidad clínica para evaluar inicialmente el manejo de estos pacientes y hasta cierto punto predecir su curso clínico.

Las células leucémicas expresan en su superficie una inmunoglobulina que puede haber sufrido, o no, mutaciones somáticas en los genes de las regiones variables de la cadena pesada (*IGVH*). El pronóstico de los pacientes con CLL que tienen el gen *IGVH* no mutado (>98% de identidad con la línea germinal) es inferior a aquellos que lo tienen mutado. La expresión de ZAP70 o CD38, se correlaciona frecuentemente con la expresión de genes *IGVH* no mutados, por lo que suelen utilizarse también como herramienta para predecir un peor pronóstico (Tabla 2).¹⁷⁻¹⁹

Tabla 2: Indicadores pronósticos asociados a peor supervivencia en CLL

Sistemas de estadiaje:

Rai

Binet

Parámetros biológicos:

Alteraciones citogenéticas:

del17p

del11q

del6q

Gen *IGVH* no mutado

Expresión de ZAP70

Expresión de CD38

Marcadores séricos:

Elevación de CD23

Elevación de timidín cinasa

Elevación de β 2-microglobulina

Parámetros cinéticos

Tiempo de duplicación linfocitario inferior a 12 meses

1.1.2 Valor de la biopsia ganglionar en el seguimiento del paciente con CLL

A pesar de que el diagnóstico de CLL se puede realizar mediante el estudio morfológico y el inmunofenotipo de sangre periférica, la biopsia ganglionar puede ser de gran utilidad en casos de difícil diagnóstico y, sobretodo, cuando existe sospecha de transformación o de evolución a una forma más agresiva de la enfermedad.

La biopsia del ganglio en la CLL muestra una arquitectura borrada por una proliferación linfoide que adopta un patrón vagamente nodular, constituida por áreas claras que corresponden a centros de proliferación donde están los prolinfocitos y parainmunoblastos, y áreas oscuras constituidas por linfocitos de tamaño pequeño. Habitualmente el índice mitótico en los centros de proliferación es muy bajo.²⁰

En los últimos años se ha demostrado que los centros de proliferación en la CLL ejercen un papel más importante de lo que se había pensado clásicamente, y su análisis puede llegar a tener repercusiones en el pronóstico de la enfermedad. Los estudios de secuenciación del receptor de las inmunoglobulinas indican que existe un repertorio de genes restrictivo y sesgado en el gen *IGHV*, que es lo que se designa como CLL estereotipada, e indica que la exposición a determinados antígenos podría estar involucrada en la patogenia de esta neoplasia.²¹ Dado que la exposición antigénica debe realizarse en los tejidos, los centros de proliferación parecen un lugar razonable donde se lleve a cabo este proceso, de manera análoga a lo que acontece en los centros germinales de los ganglios reactivos.²² En este microambiente las células de la CLL interactúan con células mesenquimales estromales, células monocíticas “nurse-like” y linfocitos T. Estas poblaciones de células atraen y protegen a las células leucémicas, favorecen su supervivencia y promueven la progresión de la enfermedad.²³ Se ha observado que en los centros de proliferación existe una mayor expresión de reguladores transcripcionales como IRF4, lo que sugiere que la activación de las vías de señalización de las células B y, por consiguiente, su diferenciación y supervivencia, ocurre en este compartimento.^{24,25} De hecho, se ha demostrado que el tamaño de los centros y el grado de proliferación celular en este compartimento tienen implicaciones

pronósticas, ya que los pacientes con CLL con centros de proliferación grandes y expandidos y con elevada proliferación tienen una supervivencia más corta que los pacientes con una CLL convencional (Figura 3).²⁶

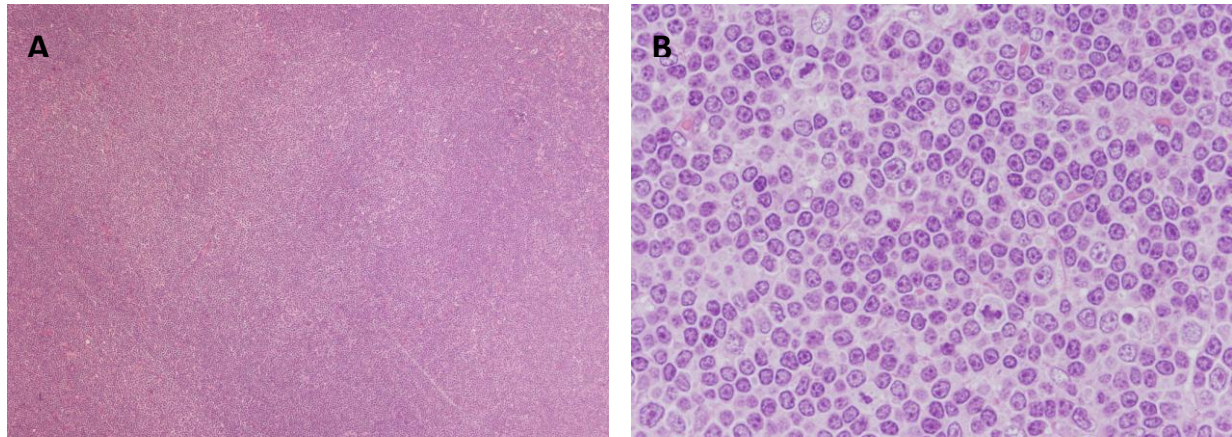


FIGURA 3: CLL ACELERADA. A) Los centros de proliferación están expandidos y confluyen. B) El índice mitótico es elevado dentro de los centros de proliferación

Generalmente no se requiere del aspirado o la biopsia de médula ósea para el diagnóstico de CLL. Sin embargo, éstos pueden ayudar a evaluar factores que puedan contribuir a citopenias, que pueden estar o no relacionadas con la infiltración leucémica de la médula.¹⁵ El patrón de infiltración difuso de la médula se asocia a un peor pronóstico ya que refleja una mayor carga tumoral. Los centros de proliferación pueden estar presentes en la biopsia de médula ósea, pero hasta el momento no se ha descrito que tengan un valor pronóstico.

1.1.3 Patogénesis molecular de la CLL

Un 80% de los pacientes con CLL tienen alteraciones citogenéticas aunque ninguna de ellas es específica de esta leucemia. La delección del brazo largo del cromosoma 13 (del(13)(q14)) representa la alteración citogenética más frecuente en CLL y típicamente se caracteriza por un curso benigno cuando no se halla asociada a otras alteraciones. Las delecciones del brazo largo del cromosoma 11 (del(11q)) se encuentran entre el 10-25% de los pacientes y frecuentemente afectan al gen *ATM*, una kinasa involucrada en la respuesta al daño en el DNA. Estos pacientes suelen manifestar grandes masas

adenopáticas, una progresión rápida y una menor supervivencia. La trisomía 12 se observa en el 10-20% de los pacientes, aunque se desconocen qué genes en este cromosoma pueden estar implicados en la patogénesis de la enfermedad. Las deleciones del brazo corto del cromosoma 17 (del(17p)) se encuentran en el 5-8% de los pacientes y frecuentemente afectan al gen *TP53*, que es un gen supresor de tumores. Las mutaciones de *TP53* se encuentran en el 4-37% de los pacientes con CLL, y la presencia de las mismas y/o del(17p) se asocian con un pronóstico muy desfavorable y refractariedad a tratamientos convencionales. La mayoría de los pacientes que presentan la deleción de 17p en un alelo, muestran mutaciones de *TP53* en el otro alelo, por lo que la función de este gen queda abolida (Figura 4).^{16,27,28}

Los estudios de secuenciación masiva del genoma de la CLL han proporcionado una visión global de las mutaciones de genes en esta enfermedad y han demostrado que existe una marcada heterogeneidad genética, con un número relativamente grande de genes mutados recurrentemente en baja frecuencia (2-5%) y sólo unos pocos genes mutados en un 12-15% de los pacientes. Sin embargo, hasta en un 30% de los pacientes con CLL no se puede identificar la presencia de ninguno de los 50 genes más recurrentemente mutados, limitando así el desarrollo de nuevas terapias contra esta enfermedad (Figura 5).²⁹

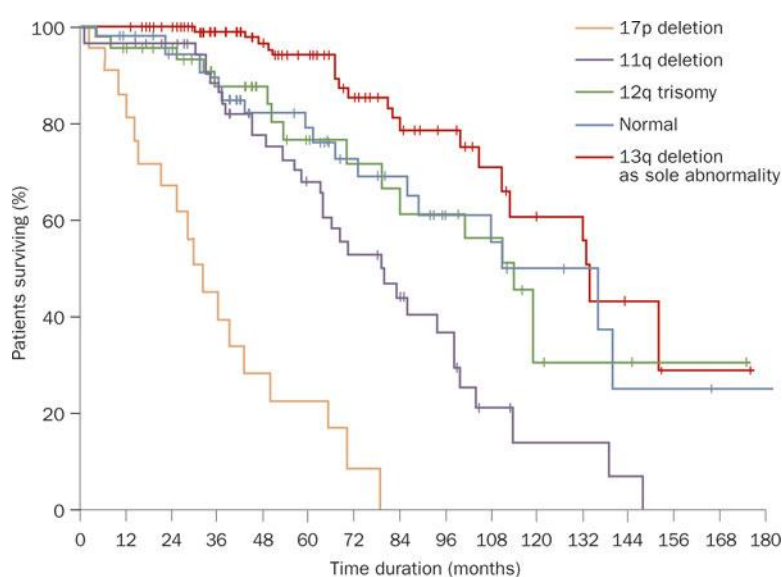


FIGURA 4: Impacto de la citogenética en la supervivencia de los pacientes con CLL. Adaptación de Cramer et al, 2011.

Un hallazgo importante es la diferente distribución de los genes mutados en los dos subtipos de enfermedad, con *IGHV* mutado o no mutado. Muchos de estos genes tienden a agruparse en determinadas vías de señalización. Así, los genes que pertenecen a mecanismos de control del ciclo celular y respuesta a daño celular (*TP53*, *ATM*, *POT1*, *BIRC3*), los mecanismos de *splicing*, procesamiento y transporte de mRNA (*SF3B1*, *U2AF2*, *XPO1*, *DDX3X*) y los mecanismos de señalización de la vía NOTCH (*NOTCH1*, *FBXW7*) ocurren más frecuentemente en CLL no mutadas mientras que, las alteraciones en genes que participan en la respuesta inflamatoria innata (*MYD88*, *TLR2*, *MAPK1*) parecen ser más específicos de la CLL mutada (Figura 5).³⁰⁻³² Estos hallazgos sugieren que el comportamiento clínico diferente de estos dos tipos de CLL puede estar relacionado con la activación de mecanismos moleculares diferentes.

Las mutaciones del gen *NOTCH1* se identifican entre el 5 y 10% de los pacientes diagnosticados de CLL, mientras que su prevalencia aumenta al 15-20% en CLL que progresan requiriendo tratamiento, y hasta el 30% en pacientes con síndrome de Richter.^{6,7,33} Las mutaciones de este gen suelen agruparse en torno a una zona concreta que afecta al exón 34 y que suele representar la delección de dos pares de bases, son más frecuentes en pacientes con *IGHV* no mutado y tienden a asociarse con la presencia de trisomía 12.

Las mutaciones del gen *SF3B1* se encuentran en un 5-18% de los casos de CLL al diagnóstico, en un 15% de los pacientes que progresan y requieren tratamiento y en hasta el 20-25% de los pacientes resistentes a fludarabina y/o que recaen después de tratamiento.³³⁻³⁵ El gen *SF3B1* codifica un componente de la maquinaria de *spliceosoma*, por lo que estas mutaciones conllevan a una alteración del *splicing* normal y alternativo del mRNA.

MYD88 es un gen que se encuentra mutado con una frecuencia baja en CLL. Codifica para una molécula adaptadora de la vía de señalización del toll-like receptor (TLR)/receptor de interleukina-1. Está implicado en la producción de

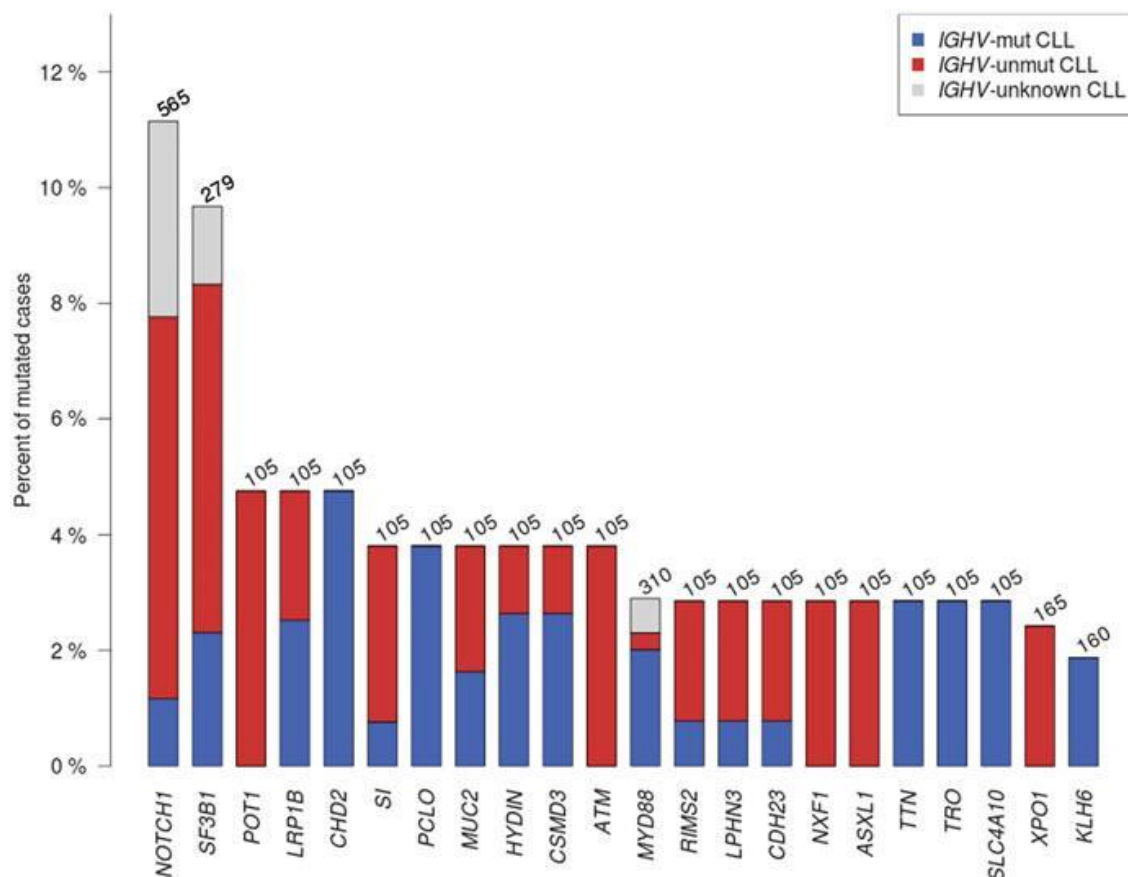


FIGURA 5. Repertorio de mutaciones en CLL. Frecuencia de las mutaciones somáticas mas comunes en CLL según el estado mutacional de IGVH. Adaptación de Martinez-Trillos et al, Recurrent Mutations in CLL, Advances in CLL, Springer 2013.

citokinas proinflamatorias en respuesta a un amplio abanico de estímulos del TLR. Las mutaciones activantes de este gen suelen ocurrir en CLL con *IGHV* mutados y, característicamente, aparecen en individuos jóvenes, significativamente más jóvenes que la media de diagnóstico de los pacientes de CLL.³⁶

A pesar de identificar determinadas alteraciones moleculares, hay mutaciones clonales que se encuentran en todas las células neoplásicas de CLL, y mutaciones subclonales que representan eventos adquiridos durante el desarrollo de la enfermedad.³⁷⁻⁴⁰ El número de alteraciones subclonales es mayor en pacientes que han recibido tratamiento y aumenta paralelamente con el número de líneas terapéuticas. Esta aproximación permite definir el orden cronológico de aparición de mutaciones a lo largo de la progresión de la enfermedad. Así, las mutaciones en *MYD88*, del(13q) y trisomía 12 son

consideradas como clonales, mientras que las alteraciones de *TP53*, *ATM* y *SF3B1* son eventos tardíos y muy probablemente elementos relevantes en la progresión.^{32,41,42} Además, pequeños subclones que contienen estas mutaciones pueden encontrarse ya desde el inicio de la enfermedad en cantidades indetectables. Se ha observado que los pacientes con pequeños subclones de *TP53* mutado presentan similares características clínicas y de supervivencia que los pacientes que tienen alteraciones clonales de *TP53*, y que tras el tratamiento quimioterápico, estos pequeños subclones de *TP53* acaban siendo predominantes, por lo que su detección puede anticipar una posible refractariedad al tratamiento.⁴¹

Las alteraciones epigenéticas juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer. En este sentido, las modificaciones más estudiadas son las metilaciones de los residuos de citosina de los pares CpG, para hacer una metilcitosina. El panorama epigenómico habitual en la transformación neoplásica es definido por una hipometilación general combinada con hipermetilación local y frecuentemente sobreexpresión de DNA metiltransferasas, que conllevan a inestabilidad genómica y activación oncogénica.⁴³⁻⁴⁵ El estudio más amplio realizado sobre el metiloma de la CLL confirma diferencias en metilación global entre CLL mutada y no mutada. Estos cambios en la metilación presentan una similitud a las diferencias encontradas entre células B naïf y de memoria, sugiriendo que las células naïf serían el origen de las CLL no mutadas, mientras que los linfocitos B de memoria serían el origen de la CLL mutada. Este hallazgo supone un cambio en la idea de que la célula de origen en la CLL correspondía a un linfocito B que ha experimentado un estímulo antigénico, y sugiere que los dos subtipos de CLL derivan de estadios diferentes de este proceso a través de la adquisición de mutaciones y alteraciones genómicas que afectan a diferentes genes (Figura 6).⁴⁶

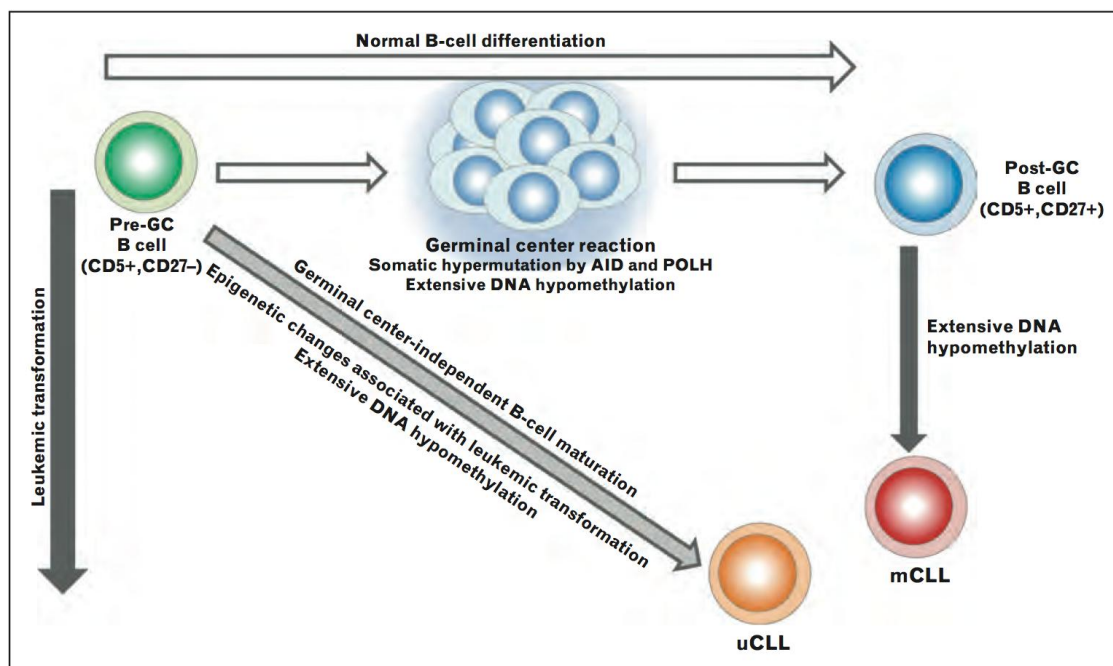


FIGURA 6. Modelo del desarrollo de CLL basado en datos epigenómicos y de expresión génica. Adaptación de Martin-Subero, 2013.

1.2 Linfoma Folicular

1.2.1 Generalidades del linfoma folicular

El linfoma folicular (FL) es un proceso linfoproliferativo derivado de una población de células B del centro germinal del folículo linfoide y que histológicamente remeda la formación de folículos linfoides secundarios. Es el segundo linfoma B más frecuente en los países occidentales, después del linfoma difuso de células grandes, y representa un 20-30% de todos los linfomas no Hodgkin. Afecta fundamentalmente a adultos con una edad media en la sexta década, con una razón hombre-mujer de 1:1,7.²⁰ En la población de pacientes pediátricos, el FL es raro y afecta predominantemente a varones. En términos generales, el FL se considera un linfoma indolente con una evolución clínica que se caracteriza por la progresión lenta durante muchos años. Sin embargo la evolución clínica de los pacientes con FL puede ser sorprendentemente variable y, en consecuencia, las opciones de tratamiento

varían desde una conducta expectante a la terapia agresiva, incluyendo altas dosis de quimioterapia y trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. En la era pre-rituximab la mediana de tiempo de supervivencia global de los pacientes con FL variaba entre ocho y diez años. Sin embargo, las nuevas estrategias terapéuticas, que incluyen anticuerpos monoclonales y nuevos fármacos, han prolongado considerablemente la supervivencia.^{47,48} Los pacientes con FL generalmente manifiestan adenopatías generalizadas asintomáticas, que pueden crecer y disminuir de tamaño espontáneamente a lo largo de la evolución de la enfermedad. La afectación de la médula ósea está presente en el 70 % de los pacientes, mientras que la afectación de otros órganos es poco frecuente. Menos del 20% de los pacientes presentan síntomas B y también menos del 20% de los pacientes presentan un aumento de LDH.²⁰ La afectación intestinal es una forma de presentación localizada de la enfermedad, por lo general, en estadios iniciales y tiene un pronóstico favorable.⁴⁹

Los dos parámetros que evalúan mejor el pronóstico de los pacientes con FL son el “Índice Pronóstico Internacional del FL” (FLIPI) y el grado histológico tumoral.⁵⁰ También existe evidencia de que las características de las células asociadas al microambiente tumoral influyen en el comportamiento de la enfermedad y en el pronóstico.⁵¹⁻⁵³ El FLIPI se desarrolló a partir de un estudio internacional sobre los datos de supervivencia de 4.167 pacientes con FL

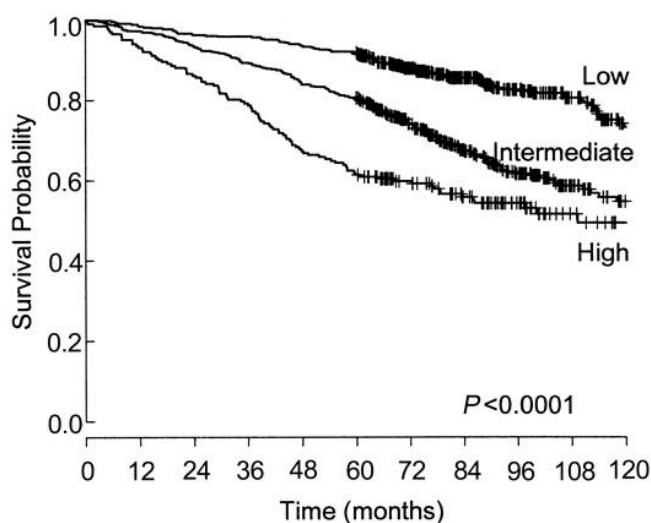


FIGURA 7: Supervivencia de los pacientes según el grupo de estratificación de riesgo mediante el índice FLIPI. Adaptación de Solal-Celigny, 2004.

diagnosticados entre 1985 y 1992, e incluye estos cinco factores pronósticos: edad del paciente, el estadio, el número de regiones linfáticas involucradas, LDH sérica y hemoglobina.⁵⁴ Desde la incorporación del rituximab en el tratamiento de primera línea del FL el FLIPI ha seguido siendo un modelo de pronóstico útil (Figura 7).⁵⁵

Los FL se clasifican en grados de 1 a 3 y este grado tiene utilidad pronóstica. Parece que no hay evidencia que indique que se precise un enfoque terapéutico diferente entre los grados 1 y 2. En cambio, las diferencias tanto en el comportamiento clínico como en el perfil genético molecular sugieren que FL grado 3A es una enfermedad indolente y se comporta como un FL grado 1 o 2 mientras que el 3B es una enfermedad agresiva comportándose como un DLBCL aunque la arquitectura folicular está intacta.^{20,56-59} A diferencia del DLBCL, la tasa de recaída del FL 3B es mayor en algunas series, pero la supervivencia es más larga.⁶⁰ El hecho de que muchos estudios incluyan conjuntamente grados 3A como 3B podría tener un impacto en la interpretación de los resultados. Recientemente una serie ha observado un pronóstico similar entre los grados 3A y 3B.⁶¹

La investigación del microambiente celular del FL ha proporcionado datos interesantes en relación a la biología del tumor y al pronóstico.^{51,53,62-66} Se ha sugerido que el FL es una enfermedad inmunológicamente funcional en el que una interacción entre las células tumorales y el microambiente determina el comportamiento clínico. Así, se ha observado que el predominio de un subtipo de células T en el tejido ganglionar se asocia a un pronóstico favorable, mientras que la activación de macrófagos es un factor pronóstico desfavorable.^{53,65}

1.2.2 Papel de la biopsia ganglionar en el diagnóstico del FL

La biopsia ganglionar es fundamental para el diagnóstico del FL. Ésta debe realizarse preferiblemente en biopsia excisionales de ganglios linfáticos, ya que permite evaluar mejor el grado y el patrón arquitectural. En los pacientes con ganglios accesibles este método es el más recomendado. En pacientes con afectación de ganglios profundos y de difícil acceso, puede realizarse el diagnóstico de FL mediante punción aspiración con aguja fina o biopsias con

aguja gruesa, siempre que se obtenga material adecuado para realizar técnicas adicionales que permitan establecer un diagnóstico diferencial (inmunohistoquímica, citometría de flujo, PCR para reordenamientos de *IGHV* o del *TCR* y FISH) y que permita documentar la naturaleza clonal de la neoplasia. El grado histológico no se puede establecer mediante punción aspiración con aguja fina.⁶⁷

El FL es una neoplasia que tiende a imitar la situación de las células B normales del centro germinal, y por ello suele rodearse de células T foliculares que expresan CD3, CD4, y marcadores de células T_H más específicos como CD57, PD1 y CXCL13, así como de células dendríticas foliculares.⁶⁸ Histológicamente el FL reemplaza la arquitectura normal del ganglio con una proliferación de folículos neoplásicos que contienen centros germinales atípicos y zonas del manto atenuadas o ausentes. Estos folículos están compuestos por una mezcla de dos tipos principales de células neoplásicas, centrocitos y centroblastos en proporciones variables, y no presentan la imagen característica en cielo estrellado ni el patrón de zonación de los centros germinales reactivos que se dividen en una zona oscura altamente proliferativa y una zona clara de menor proliferación.²⁰ La afectación de la médula ósea es muy frecuente en el FL y característicamente los infiltrados se localizan en la zona paratrabecular, pudiéndose extender hacia el intersticio medular.

El FL puede ser clasificado en grados 1, 2, 3A y 3B de acuerdo con el número de centroblastos y la presencia o ausencia de centrocitos. En los grados 1 y 2 el número de centroblastos no excede los 150 en los folículos en 10 campos de gran aumento (CGA). El FL grado 3 se presenta con más de 150 centroblastos por 10 CGA. Se considera un grado 3A si los centrocitos siguen presentes en los folículos neoplásicos, mientras que en el grado 3B los folículos están completamente compuestos por centroblastos. El fenotipo de las células es similar al de las células B del centro germinal, con expresión de CD10, BCL6, HGAL y LMO2 en la mayoría de casos, y sobreexpresión de BCL2 (Figura 8).^{20,69}

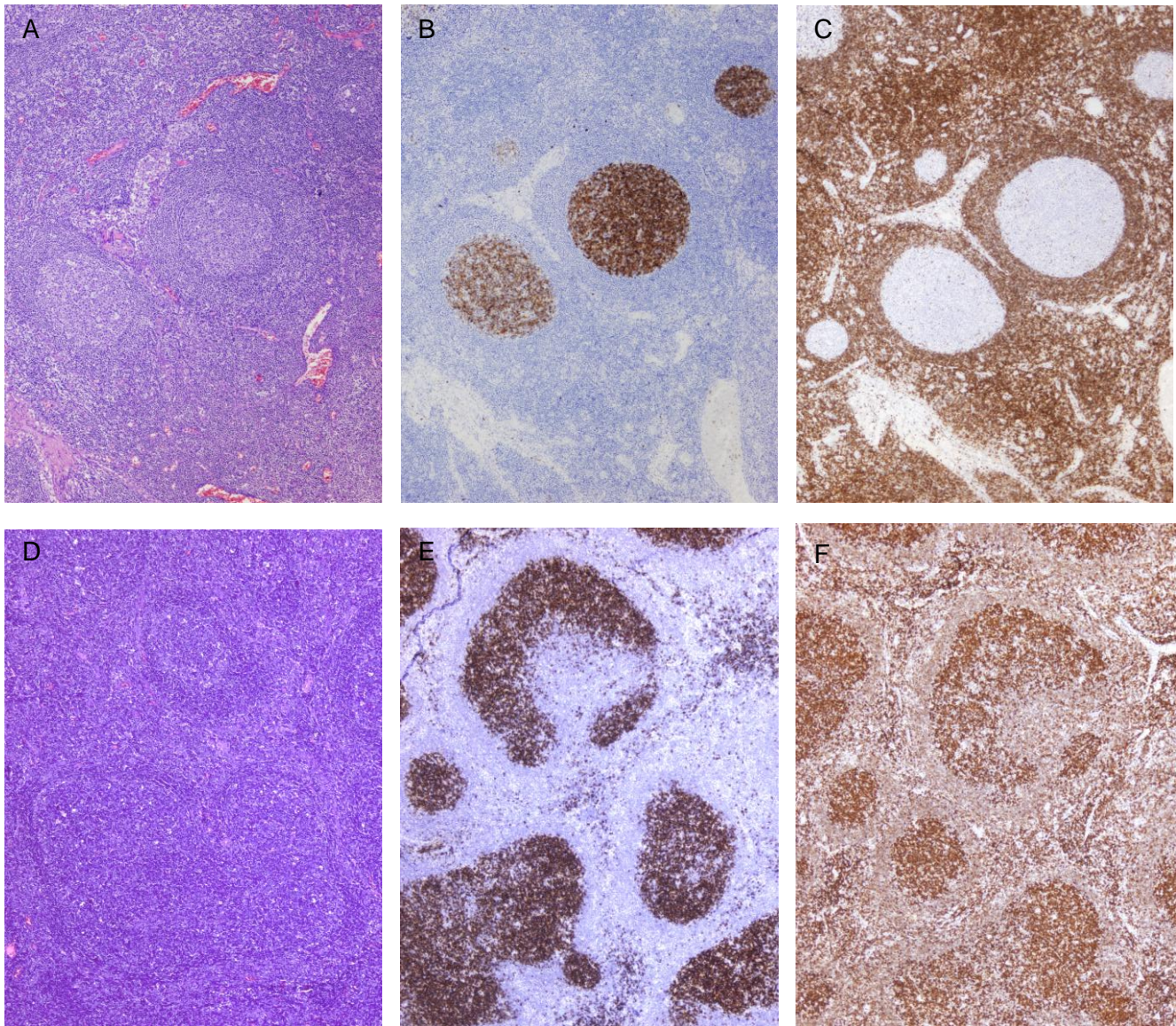


FIGURA 8: Comparación histológica entre un folículo reactivo (línea superior) y un linfoma folicular (línea inferior). Las imágenes B y E corresponden a tinción para CD10 y las imágenes C y F, a BCL2

1.2.3 Patogénesis molecular del FL

Desde un punto de vista molecular, el FL se caracteriza por la presencia de la $t(14;18)(q32;q21)$. Esta alteración se encuentra en un 90% de los FL y está considerada como un evento genético inicial en la patogénesis de esta neoplasia.^{70,71} Esta translocación aparece en estadios iniciales en la maduración del linfocito B durante la recombinación VDJ de los genes *IGHV* en la médula ósea, e involucra el locus *IgH* (14q32.3) y el locus *BCL2* (18q21.3). Esto conlleva a una expresión aberrante de BCL2. Esta proteína ejerce una función antiapoptótica sobre las células, por lo que su sobreexpresión confiere

una ventaja de supervivencia, ya que estas células son incapaces de entrar en apoptosis durante los procesos de maduración y cambio de clase de inmunoglobulina en el centro germinal. En esta situación las células son más propensas a acumular alteraciones cromosómicas secundarias durante su evolución clonal.⁷² Las alteraciones secundarias más frecuentes en el linfoma folicular son las ganancias en 1q, 2p, 7, 8, 12q, 18q y X, así como las deleciones de 1p, 6q, 10q, 13q y 17p.⁷³ A pesar de que la t(14;18) es muy frecuente en el FL, existe un porcentaje de pacientes que no tiene esta alteración citogenética. Se han descrito algunos FL de patrón arquitectural predominantemente difuso que carecen de la t(14;18) mientras que presentan la deleción de 1p36.3.⁷⁴

Sin embargo, la presencia de la translocación t(14;18) o la sobreexpresión de la proteína BCL2 son, por si solas, insuficientes para la transformación neoplásica completa. Varios estudios han demostrado mediante técnicas de PCR que la t(14;18) también puede ser detectada en una frecuencia baja en la sangre periférica de individuos sanos, la mayoría de los cuales nunca desarrollará un linfoma folicular.^{75,76}

En los últimos años, gracias a las tecnologías de secuenciación masiva, se han identificado mutaciones en genes asociados con la modificación de la cromatina (*EZH2*) e histonas metiltransferasas (*MLL2*, *CREBBP*).^{77,78} La inactivación del gen *MLL2* representa la segunda alteración genética recurrente mas frecuente en FL, y se detecta en el 80% de los casos, por lo que se cree que podría estar cooperando con otras mutaciones para incrementar la inestabilidad genética. Esta mutación parece ser un evento temprano en la patogénesis del FL, que indica que cambios iniciales en el epigenoma, posiblemente en combinación con la desregulación de la expresión de BCL2, pueden facilitar la transformación maligna en el centro germinal. Las mutaciones de *CREBBP*, por su parte, actúan atenuando la acetilación de *BCL6*, resultando en un incremento de la actividad de este oncogén y alterando la expresión de los genes diana de *BCL6*.^{4,79,80} Además de las frecuentes mutaciones en genes reguladores de la cromatina, otros genes que se encuentran mutados en FL incluyen aquellos involucrados en modulación inmune (*B2M*, *CD58*, *TNFRSF14*), genes de la vía JAK-STAT (*SOCS1* y

STAT6) y genes de la vía de señalización BCR/NF-κB (*BCL10*, *CARD11*, *CD79B*), muchos de los cuales han sido también identificados en DLBCL (Figura 9).^{8,81-83}

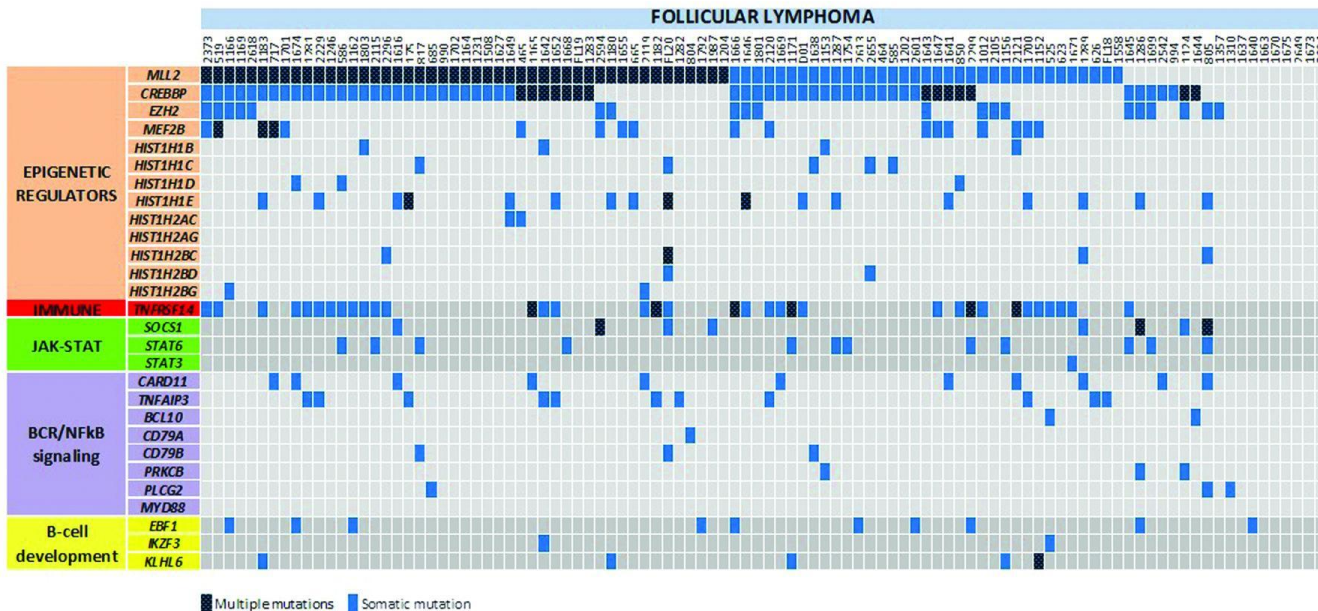


FIGURA 9: Mutaciones en el FL. Adaptado de Okosun, 2014. (Okosun Nat Genet 2014)

1.3 Linfoma esplénico difuso de la pulpa roja

1.3.1 Generalidades del linfoma esplénico difuso de la pulpa roja

El linfoma esplénico difuso de la pulpa roja (SDRPL) es un linfoma B poco frecuente que afecta primariamente al bazo y que se caracteriza por su patrón de infiltración difuso de la pulpa roja. Actualmente está considerado como una entidad provisional dentro de los linfomas esplénicos no clasificables en la actual clasificación de la OMS.²⁰

Desde el punto de vista clínico es un linfoma indolente, que suele presentarse con una linfocitosis poco llamativa, esplenomegalia y raramente con síntomas B, adenopatías generalizadas o hepatomegalia. En sangre periférica los linfocitos pueden presentar proyecciones citoplasmáticas, aunque no es un dato específico de la enfermedad. De hecho, el cuadro citológico es muy similar

al del linfoma esplénico de la zona marginal. El curso clínico es indolente, y los pacientes no suelen precisar tratamiento más allá de la esplenectomía.

El diagnóstico de esta entidad es controvertido. Existe un claro solapamiento clínico y citológico entre el SDRPL y otros linfomas B esplénicos, como el linfoma de la zona marginal, la tricoleucemia o la tricoleucemia variante. La distinción entre estas entidades puede ser difícil, y el diagnóstico debe realizarse analizando en conjunto las características citológicas, inmunofenotípicas e histológicas.

La información clínica, patológica y citogenética de que disponemos en los SDRPL es muy escasa y limitada a unas pocas series que incluyen un número pequeño de pacientes. En alguna de estas series publicadas el diagnóstico de SDRPL no está basado en la histología del bazo, y por consiguiente, no se pueden excluir otros linfomas de afectación esplénica.⁸⁴⁻⁸⁶

Histológicamente, el SDRPL se caracteriza por la presencia de infiltrados difusos de células B que afectan a los cordones y sinusoides de la pulpa roja. El infiltrado neoplásico está compuesto por una población monótona de linfocitos pequeños, con núcleo de contorno regular, cromatina vesicular y sin nucleolo prominente. El inmunofenotipo característico de estas células consiste en positividad para marcadores B como CD20 y PAX5, y para DBA44, y negatividad para CD5, Anexina A1, CD25 y CD123.

Las alteraciones citogenéticas asociadas con SDRPL no están bien definidas. Los escasos estudios que hacen referencia identifican deleciones del cromosoma 7 y trisomías de los cromosomas 3 y 18, aunque hay que tener en cuenta que estos resultados están obtenidos de una serie en la que sólo un tercio de los pacientes estudiados están esplenectomizados, por lo que no se puede descartar que en estos estudios se incluyeran otros linfomas esplénicos como el linfoma esplénico de la zona marginal, donde estas alteraciones citogenéticas son frecuentes.⁸⁷

Los estudios de secuenciación masiva del genoma han permitido identificar la presencia de genes recurrentemente mutados en algunos linfomas de presentación esplenomegálica. Sin embargo, actualmente no existen estudios

publicados que analicen la presencia de mutaciones genéticas en el SDRPL. En el linfoma de la zona marginal se han identificado mutaciones en algunos genes, siendo las más frecuentes las de *NOTCH2*, que se encuentra mutado en entre un 6 y un 25% de los pacientes y de *KLF2* (Kruppel-like factor 2), mutado entre el 10 al 40% de los pacientes.⁸⁸ *TP53*, *MLL2*, *CREBBP* y *MYD88* son otros genes que se hallan mutados con frecuencias variables.^{10,89-92} El perfil de genes mutados incluye una alta frecuencia de genes relacionados con la diferenciación marginal, por lo que estos hallazgos confirman que el SMZL es una entidad clinicopatológica distintiva, diferente de otros linfomas esplénicos.

En la tricoleucemia se ha identificado que el oncogén *BRAF* localizado en el cromosoma 7q34 se encuentra mutado en casi la totalidad de los pacientes.^{9,93,94} Este hallazgo ha permitido añadir la mutación de *BRAF* V600E como una herramienta más en el diagnóstico diferencial con otros linfomas que manifiestan un solapamiento en sus características morfológicas e inmunofenotípicas con la tricoleucemia.⁹⁵ Además del impacto diagnóstico y patogénico de la mutación de *BRAF*, ésta se ha convertido en una diana terapéutica en pacientes con tricoleucemia que manifiestan una escasa respuesta al tratamiento convencional con análogos de purinas.⁹ Existe un porcentaje de pacientes que no presentan la mutación de *BRAF*. Estos pacientes suelen tener, en cambio, mutaciones del gen *MAP2K1* y, además, frecuentemente muestran el reordenamiento del gen de las inmunoglobulinas de la familia *IGHV4-34*.^{96,97}

2.- MECANISMOS DE TRANSFORMACIÓN Y PROGRESIÓN DE LOS LINFOMAS DE BAJO GRADO

Es un hecho ampliamente documentado que algunos pacientes con linfomas de bajo grado, especialmente aquellos afectos de linfoma folicular o de leucemia linfática crónica, pueden experimentar a lo largo de los años una transformación histológica de su enfermedad con un comportamiento clínicamente agresivo. Esta entidad suele corresponder a un linfoma difuso de

células grandes, que desde un punto de vista histológico es similar a un DLBCL *de novo*. Histológicamente se caracteriza por la presencia de sábanas de linfocitos de tamaño grande que suelen borrar la arquitectura de los tejidos. Este proceso de transformación histológica sería consecuencia de la adquisición y acumulación progresiva de alteraciones genéticas secundarias, más que del resultado de un único evento mutágeno.

2.1 Mecanismos de transformación en CLL

El desarrollo de un linfoma agresivo en un paciente con CLL es un hecho infrecuente pero bien documentado, que fue descrito por primera vez por Maurice N. Richter en 1928, y que se caracterizaba por la aparición de un cuadro clínico rápidamente evolutivo de adenopatías generalizadas y hepatoesplenomegalia asociado a linfocitosis en sangre periférica.⁹⁸ Sin embargo el término de “síndrome de Richter” (SR) no fue introducido hasta 40 años más tarde por Lortholary para describir la progresión de pacientes con una CLL a una “reticulopatía maligna” en estadio terminal y que manifestaban los síntomas que había descrito Richter.⁹⁹ Con el tiempo, la definición de SR se ha ido expandiendo para incluir una miscelánea de otras neoplasias linfoides que pueden complicar el curso clínico de la CLL. La frecuencia de transformación a un SR actualmente se encuentra entre un 5–20% de los casos. Aun limitando la definición de SR a la transformación de una CLL a un DLBCL, el término incluye dos condiciones biológicas diferentes: la transformación a un DLBCL clonalmente relacionado, que constituye la mayoría de casos, y la segunda, el desarrollo de un DLBCL que no está relacionado con el clon de la CLL.¹⁰⁰ Actualmente, la transformación a SR requiere la demostración histológica, y debe ser diferenciado de una progresión de la CLL o de una CLL refractaria al tratamiento.¹⁵

El DLBCL en el SR se caracteriza por la presencia de sábanas de linfocitos B grandes. Los casos de CLL que se presentan con numerosos centros de proliferación y con un incremento en la proporción de prolinfocitos y parainmunoblastos, pero sin criterios claros de DLBCL, no deben ser diagnosticados de un SR.²⁰ Morfológicamente, se pueden distinguir variantes centroblásticas o inmunoblásticas del DLBCL, siendo las primeras las más

frecuentes. Desde el punto de vista fenotípico, aunque las células neoplásicas en la CLL suelen expresar los antígenos CD5 y CD23, estos se encuentran frecuentemente perdidos en la transformación. De hecho, la expresión de CD5 suele estar presente en un 30% de los casos mientras que la de CD23 es mas rara (15%). El marcador CD20 se encuentra generalmente expresado y representa una diana importante para la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales anti-CD20.¹⁰¹ La mayor parte de estos casos tiene un fenotipo post-centro germinal, con positividad para IRF4, mientras que sólo un 5-10% tiene un fenotipo de centro germinal, con expresión de CD10 y BCL6.^{101,102}

Los mecanismos patogénéticos subyacentes que determinan o favorecen el desarrollo de un SR no están completamente elucidados y probablemente sean múltiples. En la mayoría de los estudios, los autores han centrado las investigaciones en las alteraciones genéticas conocidas que ocurren en CLL o DLBCL.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Sin embargo, hay pocos estudios publicados basados en el análisis de todo el genoma.^{6,38,102,106,107} Los hallazgos más importantes recientemente relacionados con la patogénesis del SR son la inactivación de *TP53*, la activación de *MYC*, la trisomía 12, las pérdidas de 13q14, las mutaciones somáticas de *NOTCH1* y la pérdida de *CDKN2A*.^{6,7,102,108} Además, también se ha observado que la expresión de moléculas específicas que facilitan la interacción de las células de CLL con el microambiente, tales como la expresión del gen *IGHV4-39* reordenado de manera estereotipada (VH CDR3), está relacionada con un mayor riesgo de transformación a DLBCL.¹⁰⁶ El gen supresor de tumores *TP53* codifica para una proteína que posee un papel importante en la regulación de la respuesta al daño del DNA. Su activación en células normales conlleva la detención del ciclo celular y apoptosis y en células tumorales es un mediador de la acción antiproliferativa de muchos agentes quimioterápicos.¹⁰⁹ Por esta razón, la disrupción de *TP53* es un factor determinante en la refractariedad a la quimioterapia que caracteriza al DLBCL transformado de una CLL.

2.2 Mecanismos de transformación en FL

Aunque el linfoma folicular inicialmente es una enfermedad indolente que suele responder a diferentes tratamientos, durante el transcurso de la enfermedad se van produciendo recaídas que se acompañan de una refractariedad progresiva a la quimioterapia.¹¹⁰ Un suceso importante en la historia natural de este linfoma es la transformación a un DLBCL, que ocurre en un 25-35% de los casos.²⁰ El gold estándar que define la transformación a un linfoma más agresivo está basado en la demostración histológica de un aumento en la proporción de células grandes infiltrando difusamente los ganglios, ocasionando un borramiento total o parcial de la arquitectura folicular. Consecuentemente, la transformación se define como una progresión demostrada patológicamente y confirmada clonalmente de un FL grado 1, 2 o 3 a un DLBCL, o menos frecuentemente, a un linfoma B no-clasificable con rasgos intermedios entre linfoma de células grandes y linfoma de Burkitt, un linfoma linfoblástico o una leucemia aguda linfoblástica.^{20,111,112} La presencia simultánea de un FL y un DLBCL en la misma biopsia inicial representa una histología compuesta, un hallazgo que sugiere pero no confirma una transformación precoz de un FL y probablemente una relación clonal entre los dos tumores. Algunos investigadores consideran que se requiere al menos un intervalo de 6 meses entre el diagnóstico inicial de FL y el del DLBCL para definir inequívocamente una transformación.¹¹³⁻¹¹⁵

La progresión de un linfoma folicular de grado 1 y 2 a grado 3a no se considera transformación histológica, sino que es un evento frecuente en el curso clínico de esta enfermedad. Además de la biopsia como evidencia de progresión, una definición inequívoca de transformación requiere la demostración de una relación clonal entre el linfoma folicular original y la neoplasia subsiguiente que se puede establecer mediante técnicas de biología molecular.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Sin embargo, en la práctica clínica diaria las técnicas de clonación y secuenciación del gen de las inmunoglobulinas pueden no ser rutinarias, por lo que la demostración de una restricción de cadenas ligeras, ya sea mediante citometría de flujo o inmunohistoquímica, o la constatación de la t(14;18) en la neoplasia transformada pueden ser suficientes para sugerir la transformación y descartar una posible neoplasia secundaria no relacionada.

En muchos casos el fenotipo del DLBCL mantiene el fenotipo de centro germinal del FL preexistente.¹¹⁹ La mayoría de los casos retiene la expresión de CD10, BCL6 y BCL2, aunque ocasionalmente se pueden observar cambios antigénicos, por lo que la pérdida o ganancia de marcadores no excluye un relación clonal entre el FL y la transformación histológica.¹²⁰ Concomitantemente con la transformación, ocurre la pérdida de la arquitectura folicular y un incremento en la actividad mitótica, en gran parte por un aumento del número de centroblastos. A pesar de que se han identificado un gran número de marcadores pronósticos relacionados con la supervivencia del FL, tan sólo se ha examinado el papel biológico del riesgo de transformación en unos pocos de los mismos. La mayoría de las células B del FL dependen de la trama de células foliculares dendríticas subyacente para crecer y sobrevivir. La pérdida de esta trama y la consecuente disolución de los folículos se considera como un precursor inicial de la transformación del FL.¹²¹ De la misma manera, áreas con arquitectura difusa parecen estar asociadas a un mayor riesgo de transformación.⁵⁸ En algunos casos estos cambios están asociados con una pérdida de la expresión de CD9 en las células del FL en transformación, contribuyendo a un crecimiento de la neoplasia independiente de la trama folicular dendrítica.¹²²

Algunas alteraciones genéticas se han asociado a transformación histológica. Los análisis de muestras apareadas se usaron para implicar las mutaciones de *TP53* (cromosoma 17p) como un evento importante en la transformación histológica, ya que suelen encontrarse en el linfoma difuso de células grandes pero no en el preexistente FL.¹²³ Con la misma metodología, también se han implicado alteraciones en *p16* (cromosoma 9) que demuestran una pérdida de expresión de este gen en los linfomas transformados.¹²⁴ Estudios de expresión génica también han demostrado la implicación de *MYC* y sus genes diana en la transformación del FL.^{116,119,125} Mutaciones somáticas tanto en *BCL2* como en *BCL6* se han asociado con transformación histológica, así como las translocaciones de *BCL6* que parecen estar relacionadas con una predisposición a la transformación.¹²⁶ También las alteraciones genéticas que afectan a 1p36.3 y las mutaciones en *FAS* (cromosoma 10) se han asociado a un incremento del riesgo de transformación.^{127,128} Los estudios realizados

mediante técnicas de secuenciación masiva no han identificado eventos genéticos como responsables únicos de la transformación, sino que es probable que esta resulte de la adquisición de una constelación de alteraciones genéticas.⁸³

Además de las alteraciones genéticas adquiridas por las células malignas del FL, la interrelación entre las células tumorales y las células no neoplásicas del sistema inmune que se hallan en el microambiente tumoral también afecta al riesgo de transformación del FL. Así ha sido documentado que la disminución de la presencia de células T CD4 cooperadoras (T_H) o T reguladoras (T_{reg}) está asociado a un mayor riesgo de transformación (Tabla 3).^{53,62,129}

Tabla 3: Factores biológicos asociados a transformación histológica de LF a LDCG	
Lesiones genéticas en células tumorales	Cambios en el microambiente
pérdida <i>TP53</i>	pérdida trama células foliculares dendríticas
pérdida <i>p16</i>	incremento intrafolicular de células T CD4 ⁺
desregulación de <i>MYC</i>	incremento linfocitos Treg
mutaciones <i>BCL2/BCL6</i>	disminución de linfocitos TFH
translocaciones <i>BCL6</i>	aumento densidad microvascularización
delección 1p36	
mutaciones <i>FAS</i>	

Modificado de Lossos et al, 2011

2.3 Impacto de MYC en la progresión y/o transformación de los linfomas

El gen *MYC* es un factor de transcripción que posee numerosas funciones fisiológicas, como apoptosis, y además se puede comportar como un oncogén. Fue identificado inicialmente como el oncogén que se encontraba desregulado a consecuencia de la t(8;14)(q24;q32) en el linfoma de Burkitt. Esta translocación yuxtapone *MYC* al gen de las inmunoglobulinas, *IGH*, dando lugar a su activación mediada por los promotores de *IGH*. Posteriormente, se han identificado otros reordenamientos de *MYC* con las cadenas pesadas o ligeras de las inmunoglobulinas en otras neoplasias linfoides, las cuales se asocian generalmente a un comportamiento clínico agresivo.^{130,131} Sin embargo la translocación de *MYC* por sí misma no tiene capacidad para

originar un linfoma, lo que se apoya por el hecho de que en individuos sanos dicha translocación puede hallarse presente, indicando que por sí misma no es suficiente para desencadenar el proceso de linfomagénesis.^{132,133}

La expresión de MYC en células B normales está controlada de forma muy estricta. En las fases iniciales de la formación del centro germinal, MYC se expresa en células B tras su interacción con antígenos y células T, siendo esencial para el desarrollo del centro germinal, pero es rápidamente reprimido por BCL6. MYC es activado nuevamente en una pequeña población de células B de la zona clara, que se caracteriza por la represión de BCL6, la activación de NFκB y la expresión de IRF4. Las células B MYC negativas de la zona clara migrarán del centro germinal para diferenciarse en células de memoria B, o en células plasmáticas. La expresión de BLIMP1 en estas células reprime MYC e inicia el programa de diferenciación plasmocelular.^{134,135}

Paradójicamente, muchos linfomas con alteraciones de *MYC* se originan de células que normalmente no expresan MYC, lo que sugiere que estos tumores necesitan desarrollar mecanismos oncogénicos adicionales para superar los mecanismos reguladores de MYC y su función proapoptótica.¹³⁴ Además del linfoma de Burkitt, las alteraciones del gen *MYC* se han detectado en otros linfomas agresivos como el DLBCL, el linfoma B con rasgos intermedios entre linfoma difuso de células grandes y linfoma de Burkitt, los linfomas agresivos “doble o triple hit”, el linfoma plasmablastico y el linfoma B de células grandes Alk-positivo. Los mecanismos oncogénicos que activan MYC incluyen ganancias y amplificaciones de 8q24, translocaciones que yuxtaponen *MYC* al locus de las inmunoglobulinas y mutaciones puntuales.¹³⁵

Las alteraciones de *MYC* en linfomas de bajo grado son poco frecuentes, y se asocian, al igual que ocurre con los linfomas de células grandes, a una transformación agresiva del linfoma.¹³⁶⁻¹⁴² En la CLL, la desregulación de *MYC* se encuentra en un 26% de los síndromes de Richter.¹⁰²

Independientemente de las alteraciones que afectan al oncogén *MYC*, podemos encontrar expresión de la proteína en linfomas de bajo grado sin que se halle asociada a alteraciones genéticas. En los ganglios de pacientes con CLL se ha observado que existe una expresión proteica de MYC, y que ésta

tiende a localizarse en los centros de proliferación.^{25,143,144} Esta expresión también ha sido demostrada mediante perfiles de expresión génica.¹⁴⁵ Es posible que la sobreexpresión de la proteína no sea debida a aberraciones genéticas, tales como amplificaciones, ganancias o reordenamientos del gen, sino que resulte de la inducción de alteraciones de genes que se hallan en la vía molecular de *MYC* por encima del mismo.¹⁴⁶ La relación entre la expresión de *MYC* en centros de proliferación y el riesgo de transformación a DLBCL no ha sido investigada.

2.4 Impacto de las mutaciones de *NOTCH* en la progresión y/o transformación de los linfomas

NOTCH1 codifica una proteína transmembrana de clase I que sirve como un factor de transcripción que regula la diferenciación celular, proliferación y apoptosis. La familia de receptores *NOTCH* consta de cuatro proteínas transmembrana, que tienen un dominio extracelular de unión al ligando y un dominio intracelular responsable de la señalización.¹⁴⁷ En condiciones de reposo, el receptor es un complejo heterodimérico compuesto de dos fragmentos: el dominio extracelular (NEC), que actúa como el receptor de ligandos y por lo general se expresa en la superficie de otras células, y un componente transmembrana e intracelular (NTM) que actúa como mediador de la señal una vez que se libera a partir del componente NEC por la activación del receptor. Estos dos fragmentos se estabilizan por el dominio de heterodimerización (HD), compuesto por los fragmentos C-terminal de la NEC y el N-terminal de la NTM. La unión del ligando al componente NEC inicial desencadena una escisión proteolítica catalizada por una metaloproteinasa en el HD. Esta escisión genera una molécula truncada unida a la membrana (Figura 10).¹⁴⁸

La activación de *NOTCH* tiene un papel importante en el desarrollo de las células T normales. Se han identificado mutaciones somáticas en el 60% de los pacientes con leucemia aguda linfoblástica T. Muchas de las mutaciones en esta leucemia afectan al dominio HD o al dominio PEST. El significado biológico de estas dos mutaciones es diferente. Las mutaciones en el dominio

HD generan una activación del receptor con un potencial oncogénico importante. Las mutaciones en el dominio PEST generan un codón prematuro de “stop”, que trunca la proteína, la hace más estable y se acumula en las células tumorales.

La mayoría de mutaciones en *NOTCH* detectadas en CLL ocurren en el dominio de transactivación (TAD) o en el dominio PEST, y generan una proteína truncada más estable que se sobreexpresa en la célula. En la CLL, un 85% de las mutaciones de *NOTCH1* ocurren en el dominio PEST.^{6,7} Recientemente se han identificado nuevas mutaciones que afectan a una región no codificante 3'UTR del exón 34. Estas mutaciones producen un splicing anómalo del mRNA dando lugar a una proteína sin el dominio PEST, estabilizando la proteína al igual que ocurre con las mutaciones en el dominio PEST.¹⁴⁹

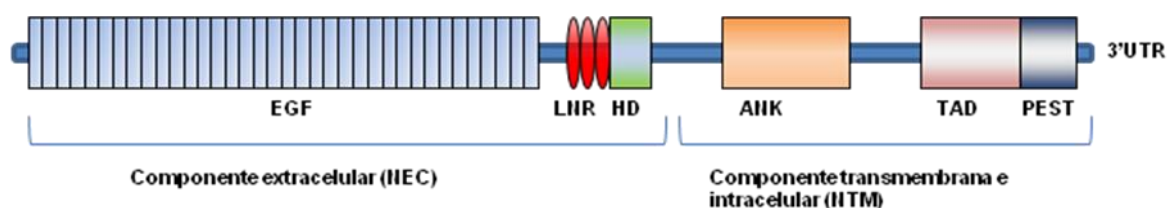


FIGURA 10: Representación esquemática del gen *NOTCH1*

La asociación de las mutaciones de *NOTCH1* en los dominios TAD y PEST es relevante porque actúan sinérgicamente activando la vía de señalización de *NOTCH1*, y están asociadas a una forma más agresiva de la enfermedad.¹⁵⁰ El potencial oncogénico de las mutaciones de *NOTCH1* y sus consecuencias en los pacientes con CLL no se hallan completamente establecidos. La estimulación de células de CLL por ligandos de *NOTCH* aumentan la activación de la vía de NFκB y la supervivencia celular, mientras que la inhibición de la señalización de *NOTCH* acelera la apoptosis espontánea de las células de CLL, sugiriendo que *NOTCH* juega un papel manteniendo la supervivencia de estas células neoplásicas.¹⁵¹

Algunos estudios han descrito el impacto pronóstico de las mutaciones de *NOTCH1* y su asociación con otras variables clínico-biológicas, en la CLL. Estas ocurren más frecuentemente en CLL con *IGHV* no mutado y alta expresión de ZAP70 o CD38. Los pacientes se presentan además con estadios de Rai y Binet avanzados, y niveles elevados de LDH y β 2-microglobulina. Los pacientes de CLL con mutaciones en *NOTCH1* suelen tener menos frecuentemente deleciones del brazo largo del cromosoma 13, y presentan con una mayor frecuencia trisomía del cromosoma 12.^{6,7,152-154} Esta asociación entre mutación de *NOTCH1* y parámetros asociados a un pronóstico desfavorable en la CLL se ve reflejada en una disminución de la supervivencia global y de la supervivencia libre de progresión. Además, estos pacientes requieren tratamiento más frecuentemente y más precozmente que los pacientes que no tienen la mutación de este gen.^{152,154}

Además de asociarse a factores de mal pronóstico, la mutación de *NOTCH1* se ha asociado en la CLL con la transformación a un DLBCL o síndrome de Richter. Los pacientes con la mutación evolucionan a un síndrome de Richter más frecuentemente y más rápidamente que los pacientes no mutados (31% en *NOTCH1* mutado vs 6% en *NOTCH1* no-mutado). La mayoría de estos linfomas agresivos están clonalmente relacionados con la CLL de base.^{6,7,152,154}

Además de la CLL, las mutaciones en el gen *NOTCH* también se han identificado en otros linfomas B. En el linfoma de células del manto se ha demostrado la mutación de *NOTCH1* en una pequeña proporción de pacientes.¹¹ Al igual que en CLL, la mutación de *NOTCH1* se asocia a un curso más agresivo con una disminución de la supervivencia global en este linfoma. En el linfoma esplénico de la zona marginal se han identificado mutaciones recurrentes en *NOTCH2*. El impacto pronóstico de la mutación de *NOTCH2* en este linfoma esplénico es controvertido, aunque parece que los estudios mas recientes indican que esta mutación, similar al efecto de la mutación en *NOTCH1*, comporta un pronóstico más desfavorable.^{10,92,152}

HIPÓTESIS

La progresión y/o transformación histológica de un linfoma indolente de bajo grado a un linfoma de alto grado es una característica que ocurre con una frecuencia que oscila entre el 5 y el 25% y claramente comporta un pronóstico desfavorable. El curso clínico de estos pacientes es agresivo con necesidad de tratamiento activo e intensivo similar al de los linfomas de alto grado. La forma más frecuente de transformación de la CLL o el FL es la de un linfoma difuso de células grandes. Sin embargo, existen transformaciones a formas histológicas poco frecuentes y escasamente documentadas tales como la transformación plasmablastica. Al igual que en los linfomas plasmablasticos que se manifiestan de entrada sin una fase previa de linfoma indolente, la hipótesis del primer trabajo plantea que las alteraciones citogenéticas subyacentes en este tipo de transformación que acontece en linfomas de bajo grado podrían implicar al gen *MYC* en su desarrollo. Si ello ocurriera, permitiría identificar un subtipo de transformación posiblemente más agresiva y que podría requerir un planteamiento terapéutico diferente al clásico utilizado para tratar la forma de transformación mas frecuente, es decir un DLBCL.

Los estudios de secuenciación masiva en algunos linfomas como la CLL están aportando datos relevantes sobre mutaciones en genes que tienen también un impacto pronóstico en el curso clínico del paciente. *NOTCH1* es uno de estos nuevos genes mutados, que aunque ya se conocía previamente en la leucemia linfoblástica T, parece asociarse a un curso agresivo en la CLL y MCL. La hipótesis planteada en el segundo trabajo consistió en que al igual que la CLL y el MCL, podrían existir mutaciones en *NOTCH1* o *NOTCH2* en el linfoma folicular, que podrían conferir un peor pronóstico o un mayor riesgo de transformación a linfoma difuso de células grandes en este linfoma. La identificación de estas mutaciones, permitiría demostrar que las mutaciones de *NOTCH* son un mecanismo que de hecho comparten o es común en una variedad de linfomas de bajo grado, y permitiría elucidar hasta cierto punto los mecanismos de transformación en el linfoma folicular.

El tercer trabajo se centró en un linfoma de bajo grado pobremente caracterizado, el linfoma esplénico difuso de la pulpa roja o SDRPL. Este

linfoma es muy poco frecuente, existen muy pocas series publicadas y hay cierta controversia sobre los criterios diagnósticos y su relación con el SMZL o la tricoleucemia variante. Además, no existe ningún estudio que haya investigado la presencia de mutaciones en genes involucrados en otros linfomas B de bajo grado y la información sobre la progresión a un curso agresivo es muy escasa. La hipótesis de este trabajo es que el SDRPL probablemente presenta mutaciones en genes o alteraciones cromosómicas que se hallan implicados en linfomagénesis, particularmente en linfomas de bajo grado primariamente esplénicos como el SMZL. La información de alteraciones cromosómicas en SDRPL es limitada y dado que el estudio histológico del bazo es en estos momentos imprescindible para el diagnóstico de este linfoma es posible que algunas series publicadas anteriormente pudieran haber incluido casos de SMZL o linfoma linfoplasmacítico al no considerar las características histológicas como criterio. En el tercer trabajo se analizan las alteraciones cromosómicas y mutaciones de genes en una serie de pacientes con SDRPL en los que el diagnóstico se basó en la histología esplénica.

OBJETIVOS

Primer trabajo:

- Caracterizar los rasgos histológicos e inmunohistoquímicos de la transformación plasmablástica en la leucemia linfática crónica (CLL) y linfoma folicular (FL).
- Estudiar las alteraciones citogenéticas presentes en la transformación plasmablástica y con especial énfasis el estado de gen *MYC*.

Segundo Trabajo:

- Establecer la presencia y frecuencia de las mutaciones de los genes *NOTCH1* y *NOTCH2* en el FL.
- Correlacionar las características histológicas de los FL con y sin las mutaciones de *NOTCH*.
- Analizar la evolución clínica de los pacientes con mutaciones de *NOTCH* y el papel que poseen en la progresión y transformación del FL.

Tercer Trabajo:

- Caracterizar de manera detallada las características histológicas e inmunohistoquímicas del linfoma esplénico difuso de la pulpa roja (SDRPL).
- Estudiar la presencia de mutaciones en *BRAF*, *MAP2K1*, *MYD88*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *SF3B1* y *TP53* en SDRPL, que son genes que también se encuentran mutados en otros linfomas de bajo grado.
- Estudiar las alteraciones citogenéticas presentes en SDRPL mediante cariotipo, FISH o *arrays* de *copy number*.
- Analizar la evolución clínica de los pacientes con SDRPL y correlacionarla con las alteraciones citogenéticas y moleculares halladas.

RESULTADOS

Primer Trabajo

Resumen

La transformación histológica de los linfomas de bajo grado a linfoma difuso de células grandes está asociada a un pronóstico desfavorable. Aunque la diferenciación plasmocelular es común en estos linfomas, la transformación plasmablástica (PBL-T) es un fenómeno pobremente documentado . En este trabajo hemos descrito 6 casos de PBL-T que ocurren en tres pacientes con leucemia linfática crónica (CLL) y en tres con linfoma folicular (FL).

Cinco pacientes eran hombres, y la edad media fue de 65 años (rango, 52 a 72 años). Ninguno de ellos tenía historia previa de inmunodeficiencia.

En tres casos la PBL-T ocurrió entre 34 y 85 meses tras el diagnóstico inicial, y en los otros tres, la transformación se diagnosticó simultáneamente con el linfoma de bajo grado. Todos los pacientes recibieron quimioterapia tras la transformación, y cuatro de ellos fallecieron entre 4 y 24 meses tras el diagnóstico. En tres casos la PBL-T se manifestó en una región extranodal. Desde el punto de vista histológico, todos los PBL-T tenían una morfología inmunoblástica, con presencia concomitante en el tejido de células plasmáticas, que eran CD20 y PAX5 negativas, expresaban cadena ligera lambda, y cinco eran positivos para CD138. Todos los casos eran negativos para el virus HHV8, y solo en uno de los casos las células plasmablásticas fueron positivas para el virus de Epstein-Barr mediante técnicas de hibridación *in situ* del RNA de este virus . En cinco pacientes se demostró la relación clonal entre el componente de linfoma de bajo grado y la PBL-T mediante citogenética. En dos casos de CLL, ambos componentes tenían delecciones de 13q, y en todos los casos de FL, ambos componentes presentaban la translocación t(14;18). En dos casos transformados de CLL se identificaron translocaciones del gen MYC con la IGH (t(8;14)).

La transformación plasmablástica expande el espectro clínico-patológico de la transformación de los linfomas B de bajo grado. Estos tumores transformados

son clínica, histológica y fenotípicamente similares a los linfomas plasmablasticos primarios. Sin embargo, a diferencia de estos últimos, los PBL que resultan de la transformación en linfomas de bajo grado no se asocian con un estado de inmunosupresión y/o infección por el virus de Epstein-Barr y en el linfoma folicular, no manifiestan alteraciones en el gen MYC.

Plasmablastic Transformation of Low-grade B-cell Lymphomas

Report on 6 Cases

Daniel Martinez, MD,* Alexandra Valera, BSc,* Nhora Silva Perez, MD,†
 Luz Fernanda Sua Villegas, MD,† Blanca Gonzalez-Farre, MD,* Carla Sole, BSc,*
 Eva Gine, MD, PhD,* Armando Lopez-Guillermo, MD, PhD,* Gaël Roue, PhD,*
 Salome Martinez, MD,‡ Francesc Sant, MD,§ Krzysztof Warzocha, MD,|| Tadeusz Robak, MD,¶
 Magdalena Czader, MD,# Neus Villamor, MD, PhD,* Lluís Colomo, MD, PhD,*
 Elias Campo, MD, PhD,* and Antonio Martinez, MD, PhD*

Abstract: Histologic transformation of low-grade B-cell lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma is associated with poor prognosis. Although plasma cell differentiation is common in these lymphomas, an overt plasmablastic transformation (PBL-T) has been only rarely reported. We report 6 cases of PBL-T occurring in 3 chronic lymphocytic leukemias (CLL) and 3 follicular lymphomas. Five patients were men, and the mean age was 65 years (range, 52 to 72 y). None of them had history of immunodeficiency. In 3 cases the PBL-T occurred 34 to 85 months after the initial diagnosis, and in 3 it was detected simultaneously with the small cell component at diagnosis. All patients received chemotherapy after transformation, and 4 died 4 to 24 months after this diagnosis. In 3 cases, PBL-T occurred in an extranodal site. All PBL-Ts had immunoblastic morphology with admixed plasma cells, were CD20 and PAX5 negative, expressed λ light chain, and 5 were CD138 positive. All cases were negative for HHV8, and only 1 PBL-T was Epstein-

Barr virus positive. Evidence of a clonal relationship between the small cell and PBL-T components was found in 5 cases. In 2 CLL cases, both components had 13q deletions, and in all follicular lymphoma cases both components harbored the t(14;18) translocation. *MYC* translocations were observed in 2 cases transformed from a CLL. In conclusion, PBL-T expands the clinicopathologic spectrum of the transformation of low-grade B-cell lymphomas. These transformed tumors are clinically, histologically, and phenotypically similar to primary plasmablastic lymphomas, but they are not associated with immunodeficiency and rarely have Epstein-Barr virus infection or *MYC* alterations.

Key Words: plasmablastic lymphoma, Richter syndrome, follicular lymphoma, chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma, *MYC*, *BCL2*, plasma cell differentiation

(*Am J Surg Pathol* 2013;37:272–281)

From the *Department of Hematopathology and Hematology, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona; †Department of Pathology, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona; §Fundación Althaia, Manresa, Spain; ‡Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia; ||Institute of Hematology and Transfusion Medicine, Warsaw; ¶Department of Hematology, Medical University of Lodz, Lodz, Poland; and #Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Indiana, Indianapolis, IN.

Conflicts of Interest and Source of Funding: Supported by Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, and FEDER PI11/00907 (A.M.). Cofunded by the European Regional Development Fund (ERDF), European Union, One way to Europe, The Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) SAF08-3630 (E.C.), Red Temática de Investigación Cooperativa del Cáncer (RTICC) RD06/0020/0039 (E.C.), Premi Fi de Residencia Emili Letang 2011, Hospital Clinic (D.M.).

Correspondence: Antonio Martinez, MD, PhD, Hematopathology Section, Laboratory of Pathology, Hospital Clinic Villarroel 170 E3-P5, 08036 Barcelona, Spain (e-mail: antonmar@clinic.ub.es).

Supplemental Digital Content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Website, www.ajsp.com.

Copyright © 2012 by Lippincott Williams & Wilkins

Low-grade B-cell lymphomas may transform into a more aggressive lymphoma, usually a diffuse large B-cell lymphoma. This evolution occurs in 2% to 8% of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and 25% to 35% with follicular lymphoma (FL).¹ Transformation to a high-grade lymphoma with Burkitt features or blastoid transformation has been reported occasionally.^{2–4} Even when the transformed tumor is clonally related to the original lymphoma, the phenotype may differ, and the transformed tumor may exhibit different phenotypic features and a higher proliferation rate.¹

Plasma cell differentiation is a relatively common event in low-grade B-cell non-Hodgkin lymphoma as part of the cytologic spectrum of the disease, as in lymphoplasmacytic lymphoma or marginal zone lymphoma. Some cases of FLs may also have a clonally related plasma cell component.^{5–9} These encompass cases of “classic” FLs, usually with *BCL2* translocations that show postfollicular maturation to plasma cells mostly

with an interfollicular distribution.¹⁰ Similarly, plasma cell differentiation is observed in occasional cases of mantle cell lymphoma and CLL. In CLL, plasma cell differentiation may occur in vitro, after 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate stimulation,^{11–15} and in vivo, related to chromosomal abnormalities like 1p36 alterations or associated with additional copies of 3q.^{16,17} The biological meaning of plasma cell differentiation is unknown, although recent studies in vitro had shown that it may be related to resistance to new therapeutic agents in mantle cell lymphoma.¹⁸

Unlike plasma cell differentiation, an overt aggressive plasmablastic transformation (PBL-T) in the context of small B-cell lymphomas has been only rarely reported.^{19–23} A plasmablastic phenotype is characteristic of plasmablastic lymphoma (PBL), a very aggressive disease mainly presenting in extranodal sites associated with immunodeficiency.¹ A plasmablastic morphology and phenotype may be observed in other specific subtypes of large B-cell lymphoma and occasional cases of multiple myeloma.^{24–31} Whether the PBL-T of a low-grade B-cell non-Hodgkin lymphoma may mimic clinically, histologically, and biologically primary PBL has not been examined before.

Here we study 6 cases of low-grade B-cell lymphomas that had a PBL-T. This type of evolution exhibits unique clinicopathologic features and expands the histologic spectrum of transformation of small B-cell neoplasms.

MATERIALS AND METHODS

Samples and Patients

Six cases of PBL-T in the context of low-grade B-cell lymphomas were identified in the files of the contributing institutions over a period of 20 years. The original small cell lymphoid neoplasms were CLL in 3 cases and FL in 3. One case was previously reported in part (case 3).²³ Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue was available in all cases. This study was approved by the Intramural Research Boards of the participating institutions when required. Clinical information was retrieved from the files and included age at diagnosis, presenting symptoms, performance status, clinical stage of disease, serology, bone lesions, monoclonal component, time to transformation, treatments, and follow-up.

Immunohistochemistry and In Situ Hybridization

Immunohistochemical studies were carried out with a panel of monoclonal and polyclonal antibodies reactive in paraffin-embedded tissue sections (Supplemental Table 1, <http://links.lww.com/PAS/A157>) using a peroxidase-labeled detection system, standard antigen retrieval protocols, and an automated immunostainer BenchMark XT (Ventana Medical System, Tucson, AZ), Autostainer PT-Link (Dako, Copenhagen, Denmark) or BondMax (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Germany). Epstein-Barr virus (EBV) was detected using in situ hybridization with

EBV-encoded RNA (EBER) probes (Inform EBER, Ventana Medical Systems).

IgH Gene Rearrangements and Mutational Analysis

Genomic DNA was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded or frozen tissue sections by using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). For *IGHV* gene rearrangement, purified DNA was polymerase chain reaction amplified using primers to framework regions 1 and 3 (FR-1 and FR-3) and the JH regions of the immunoglobulin heavy-chain gene (IgH-polymerase chain reaction), using the BIOMED2 protocol.³² The mutational status of the *IGHV* was analyzed in case 1, following protocols described elsewhere.³³

Conventional Cytogenetics

Conventional cytogenetics were available in 3 cases, 1 of them (case 3) published earlier, and the studies were carried out as described.²³

Fluorescence “In Situ” Hybridization

Fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed on 3- to 4- μ m-thick sections of formalin-fixed paraffin-embedded tissues, using dual-color break-apart probes specific for the following loci: *MYC* (8q24), *BCL2* (18q21), and *BCL6* (3q26) (Abbott Molecular, IL). In those cases in which *MYC* or *BCL2* was rearranged and there was available material, we carried out additional analysis to determine whether *IgH* was the partner of *MYC* and/or *BCL2*, using dual-color dual-fusion probes: *MYC/IGH/CEP8* and *IGH/BCL2* (Abbott Molecular). To study the commonest copy number alterations detected by FISH in CLL, the following panel of specific loci probes was used: 11q22 (*ATM*), 13q14 (D13S319)/13q34, 17p13.1 (*TP53*), and the centromeric region of chromosome 12 (Abbott Molecular).³⁴ The FISH experiments were carried out as described elsewhere.³⁵

RESULTS

Plasmablastic Transformation in Chronic Lymphocytic Leukemia

Clinical Features

Three patients diagnosed with a CLL developed a PBL-T. Two were men and 1 was a woman, and the mean age was 60 years (range, 52 to 70 y) (Table 1). None of patients had personal or family history of immunodeficiency, and none of them received immunosuppressors. The serologies for human immunodeficiency virus, EBV, cytomegalovirus, and herpes simplex virus were negative in all patients. In 2 cases, the reason for the biopsy was the clinical suspicion of transformation during the evolution of the disease. In these 2 cases, the PBL-T occurred in an extranodal site (subcutaneous and mandibular) 47 and 85 months after the initial diagnosis of CLL. The third patient (case 1) was investigated for lymphocytosis, thrombocytopenia, and a painful large mesenteric mass. A mesenteric lymph node was obtained

TABLE 1. Clinical Features

Case	#1 CLL	#2 CLL	#3 CLL	#4 FL	#5 FL	#6 FL
Age	70	52	57	67	70	72
Sex	Male	Male	Female	Male	Male	Male
Time	0	85 mo	47 mo	0	0	34 mo
Biopsy site	LN, mesenteric	Subcutaneous tissue	Mandibular	LN, right inguinal	Jejunum	LN, laterocervical
Bone marrow involvement	Yes†	Yes†	Yes†	Yes†	—	Yes†
Stage	IV-B	IV-A	IV-B	IV	IE	IV
ECOG ≥ 2	Yes	Yes	No	Yes	—	No
High LDH	Yes	No	Yes	—	—	No
Bone lesion	No	Yes	No	Yes	—	No
M component	IgM- λ	λ	κ , λ	No	No	No
HIV	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Prior treatment	No	Cisplatin Etoposide*	2-CdA‡	No	No	No
Treatment	R-CHOP $\times 2$	R-CHOP $\times 6$	VAD $\times 1$ CHOP $\times 3$	R-CHOP $\times 6$ ESHAP $\times 4$ Auto-BMT	R-CHOP	R-CHOP $\times 3$ GEMOX
Follow-up	4 mo DwD	24 mo DwoD	6 mo DwD	20 mo DwoD	24 mo AwoD	3 mo AwoD

*For incidental seminoma.

†By low-grade lymphoma without evidence of involvement by the PBL-T.

‡Robak et al.²³

2-CdA indicates 2-chloro-2-deoxyadenosine cladribine; AwoD, alive without disease; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; DwD, died with disease; DwoD, died without disease; HIV, human immunodeficiency virus; LDH, lactate dehydrogenase; LN, lymph node.

and demonstrated simultaneous infiltration by the small lymphocytic lymphoma and the PBL-T. Two patients had B-symptoms and high levels of lactate dehydrogenase (cases 1 and 3). Only 1 patient developed bone lesions in ribs and the humeral bone (case 2). Two CLL cases had a λ monoclonal component in serum (cases 1 and 2). In case 3, immunoelectrophoresis showed a double monoclonal component in serum and urine as κ and λ -free chains, whereas the total serum immunoglobulin levels were normal. At the time of transformation, all patients had bone marrow infiltration by CLL but not by the high-grade tumor. Two patients (cases 2 and 3) received chemotherapy before the transformation. One of them received cisplatin and etoposide for an incidental seminoma, and the other received 6 cycles of 2-chloro-2-deoxyadenosine cladribine because of disease progression. After transformation, 2 patients received rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) (2 cycles in case 1, and 6 cycles in case 2). One patient (case 3) received 1 cycle of vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (VAD), followed by a salvage therapy of 3 cycles of CHOP with poor response. All patients died 4 to 24 months after the diagnosis of the transformation. The cause of death was related to the disease in cases 1 and 3.

Histologic, Immunophenotypic, and Molecular Features

The main immunophenotypic characteristics of the initial CLL and transformed tumors are summarized in Table 2. All 3 cases had a conventional CLL immunophenotype in peripheral blood with CD20^{dim} and coexpression of CD5 and CD23. Two cases showed λ and 1 κ light-chain restriction. Cases 1 and 2 had bright CD38 expression by flow cytometry and high ZAP70+ ex-

pression by immunohistochemistry. All patients had bone marrow involvement by CLL with a diffuse pattern in case 1 and interstitial in case 2. In case 3 no trephine biopsy was performed, but the bone marrow aspirate demonstrated 80% of atypical lymphocytes with a CLL cytology and phenotype.

The high-grade transformation had predominant immunoblastic morphology with admixed plasma cells and a plasmablastic phenotype negative for CD20 and PAX5 but positive for CD138 (Figs. 1G–J). In cases 1 and 3, residual CLL cells were intermingled in some areas with the PBL-T component. In all cases the high-grade lymphoma was strongly positive for Blimp1 and IRF4 (Fig. 1K) and exhibited strong nuclear expression of XBP1. IRF8 was weakly positive in all CLLs and negative in all transformed tumors. All large cells had a strong cytoplasmic λ light-chain expression, and in cases 1 and 2 the same light-chain expression was also found in the CLLs (Figs. 1F, L), whereas the CLL in case 3 expressed κ light chain.

All cases were negative for HHV8, and 2 (cases 1 and 3) were also negative for EBV by in situ hybridization for EBER genes (EBER1 and 2). The EBV-positive PBL-T of case 2 showed intense expression of EBER but was negative for LMP1 and EBNA2 genes.

Genetic Features

The main genetic features of CLL cases and transformed tumors are summarized in Table 3 and in Supplemental Table 2 (<http://links.lww.com/PAS/A158>). In case 1 the transformed tumor exhibits an immunoglobulin heavy-chain gene rearrangement of the same size as that of the CLL suggesting a clonal relationship between the 2 components. This was confirmed by sequencing of the *IGHV* rearranged gene in case 1, and both the CLL and

TABLE 2. Immunophenotypical Features

	#1 CLL		#2 CLL		#3 CLL		#4 FL		#5 FL		#6 FL	
	CLL	PBL-T	CLL	PBL-T	CLL	PBL-T	FL	PBL-T	FL	PBL-T	FL	PBL-T
CD20	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
CD79a	+	—	+	Weak	+	+	+	—/+	+	—	+	—
CD138	—	+	—	+	—	+	—	—	—	+	—	+
CD56	—	+	—	—	—	+	—	—	ND	ND	—	—
Blimp1	—	+	—	+	—	—	—	+	—	+	—	+
XBP-1s	—	+	—	+	—	+	Weak	+	—	+	—	+
IRF4	—	+	—	+	+/-	+	—	+	—	+	—	+
IRF8	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
PAX5	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
CD10	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	+	—
BCL6	—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	+	—
BCL2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EBV	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
HHV8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ZAP70	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Light chain	λ	λ	λ	λ	κ	λ	λ	λ	λ	λ	λ	λ

PBL-T tumor displayed unmutated immunoglobulin genes. This case shows the same monoclonal peak of *IgH* rearrangement that was observed in the CLL in bone marrow and peripheral blood, and in the microdissected areas of pure plasmablastic tumor suggesting a clonal relationship between these 2 processes (Supplemental Fig. 1, <http://links.lww.com/PAS/A155>). Case 3 could not be investigated.

Two CLL cases had deletion of 13q14.3 (cases 1 and 2), and 1 of them (case 1) also had a deletion of 11q22 (*ATM*), both of which are recurrent alterations described in CLL. Case 1 also presented alterations in chromosomes 9, 12q, and 1q, and case 2 had a complex translocation t(1;6;18)(p32;p21.3;p11.2), both in the CLL component. Case 3 had deletion of 1p21 and 6q13. This case also showed a hyperdiploid karyotype (69 to 75 chromosomes) with duplication of chromosomes 1, 2, 6, and 11 to 15. In cases 1 and 2, the same genetic alterations present in the CLL, the deletion of 13q14.3 and deletion of 11q22, were also found in the transformed component, suggesting an evolution of the same clone. In the PBL-T component, but not in CLL, gains of *BCL6* were observed in all cases and gains of *BCL2* in 2 of them. The t(8;14) translocation was demonstrated in the plasmablastic cells but not in the CLL cells (Figs. 3A, B) in 2 of the 3 cases (cases 1 and 3).

Plasmablastic Transformation in Follicular Lymphoma

Clinical Features

All patients were men with a median age of 70 years (range, 67 to 72 y) (Table 1). In 2 cases, the low-grade and the transformed component were simultaneously identified at diagnosis (cases 4 and 5), whereas in case 6 the transformation occurred 34 months after the initial diagnosis. None of the patients were immunosuppressed, and serologies for human immunodeficiency virus, EBV, cytomegalovirus, and herpes simplex virus were negative in all patients. In 2 patients the bone marrow was biop-

sied and showed infiltration by FL but not by the high-grade tumor. In 1 case, the transformation occurred in an extranodal site, in the jejunum, although on computed tomography scanning it was observed that some mesenteric lymph nodes also appeared to be involved (case 5). Case 4 also developed multiple lytic bone lesions, and case 6 presented thoracoabdominal lymph node involvement and splenomegaly.

All patients received chemotherapy with CHOP and rituximab achieving a complete remission. Patient 4 relapsed 1 year later. A salvage therapy with 4 cycles of etoposide, prednisolone, cytarabine, and cisplatin (ESHAP) was performed, and the patient underwent autologous bone marrow transplantation and died 20 months after diagnosis without evidence of the disease. Case 6 relapsed 2 years after the initial diagnosis of FL and received a second line of treatment with gemcitabine and oxaliplatin achieving complete remission. The transformed tumor was diagnosed 34 months after the initial FL. This patient received 20 cycles of radiotherapy and is alive without evidence of disease 10 months after transformation. The remaining patient (case 5) is still alive without evidence of the disease after 24 months of follow-up.

Histologic, Immunophenotypical, and Molecular Features

The main immunophenotypical characteristics of the tumors are summarized in Table 2. All FLs had prominent interfollicular mature plasma cells that were λ light-chain restricted. The FLs were strongly positive for CD20, PAX5, CD10, BCL6, and BCL2 (Figs. 2A–C). All cases expressed the germinal center–related transcription factor IRF8 but were negative for CD138 and IRF4 (Figs. 2A–E). All FLs expressed cytoplasmic λ light chain (Fig. 2F). In case 4, a high-grade FL (grade 3b) component was found near the diffuse transformed tumor.

The PBL-T had predominant large centroblastic and immunoblastic cytology and exhibited a plasmablastic phenotype, all being CD20 and PAX5 negative

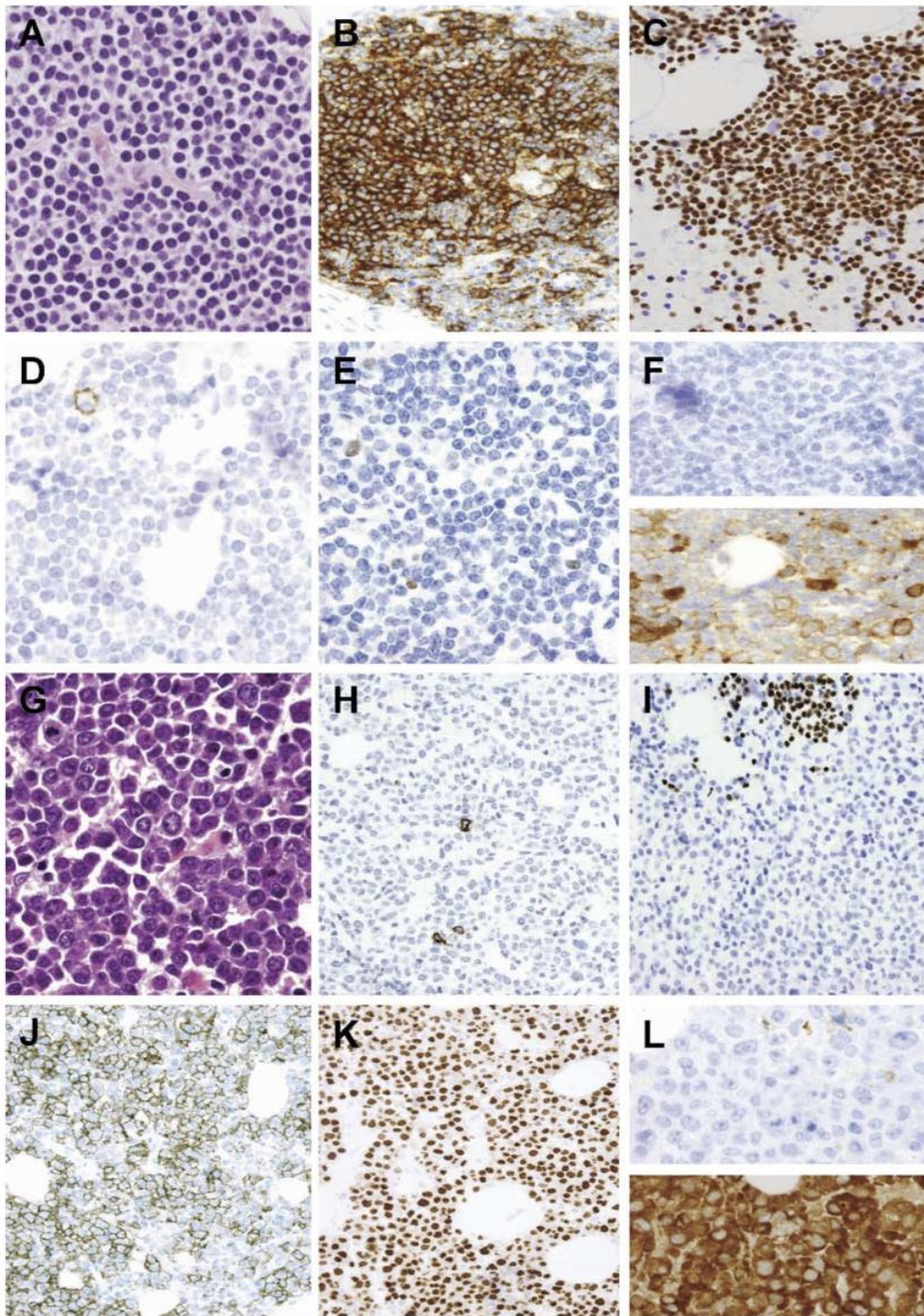


FIGURE 1. Case 1: CLL with PBL-T. A, Lymph node involvement by a diffuse infiltrate of small atypical lymphocytes (hematoxylin and eosin). The neoplastic CLL cells are positive for (B) CD20 and (C) PAX5. The plasma cell–associated markers (D) 138 and (E) IRF4/MUM1 were negative. F, Tumor cells exhibit cytoplasmic λ light-chain expression (lower panel) being negative for κ (upper panel). G, The PBL-T is composed of large atypical immunoblasts (hematoxylin and eosin), negative for (H) CD20 and (I) PAX5. The plasma cell markers (J) CD138 and (K) IRF4/MUM1 are expressed in the atypical large cells with strong (L) λ light-chain expression (lower panel) being negative for κ (upper panel).

TABLE 3. Cytogenetic Alterations

	#1 CLL		#2 CLL		#3 CLL		#4 FL		#5 FL		#6 FL	
	CLL	PBL-T	CLL	PBL-T	CLL	PBL-T	FL	PBL-T	FL	PBL-T	FL	PBL-T
Cep12	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Gains	NE	NE	NE	NE	Normal	Normal
13q	del	del 13q14.3	del	del	Gains	Gains	NE	NE	NE	NE	Normal	Normal
	13q14.3		13q14.3	13q14.3								
ATM	del	del 11q22	Normal	Normal	Gains	Gains	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
	11q22											
P53	Normal	Normal	Normal	Normal	Gains	Gains	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
MYC	Normal	Rearranged	Normal	Normal	Normal	Rearranged	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
BCL2	NE	Gains	Normal	Normal	Normal	Gains	Rearranged	Rearranged	Rearranged	Rearranged	Rearranged	Rearranged
BCL6	NE	Gains	Normal	Gains	Normal	Gains	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

NE indicates not evaluable.

and 2 of 3 being CD138 positive (Figs. 2G–J). In all cases, the PBL-T component was positive for Blimp1 and IRF4 (Fig. 2K) and showed intense nuclear expression of XBP1 with strong cytoplasmic λ light-chain expression (Fig. 2L). All cases were negative for EBV and HHV8.

Genetic Features in Follicular Lymphoma

In all cases, both components, the FL and the PBL-T tumor, harbored the t(14;18) (Figs. 3C, D). No *MYC* or *BCL6* rearrangements were found. None of the cases had deletions of 17p13.1 or 11q22.

In 2 cases with available DNA, the study of *IGHV* gene showed a monoclonal rearrangement in the FR-3 region in 1 case (case 4) and a polyclonal pattern in the other (case 6). The DNA quality did not allow studying FR-2 or FR-1 regions. In the clonal case, the same monoclonal peak was found both in the FL and in the microdissected PBL-T (Supplemental Fig. 2, <http://links.lww.com/PAS/A156>).

DISCUSSION

We report 6 unique cases of low-grade B-cell lymphomas, 3 CLLs and 3 FLs that had a PBL-T either at the initial diagnosis or in the evolution of the disease. The transformed component of all cases showed similar plasmablastic morphologic and phenotypic features. In the 5 cases analyzed, the same clonal genetic alterations were found in the low-grade lymphoma and in the plasmablastic tumor suggesting a true transformation from the original lymphoma.

PBL is an uncommon neoplasm associated mostly with immunodeficiency and EBV infection.^{25,36,37} A plasmablastic phenotype defined by the expression of plasma cell markers such as CD138, CD38, PRDM1/Blimp1, or nuclear XBP1³⁸ and lacking mature B-cell antigens such as CD20 and PAX5 is mainly found in PBLs and infrequently in other aggressive B-cell tumors.^{28,38} Nevertheless, PBL-T of low-grade B-cell lymphomas has been rarely reported. Four cases of PBL-T in CLL^{19,21–23} and 1 in FL²⁰ have been described. In all cases, the transformation arose in extranodal sites. One CLL evolved to a plasmablastic tumor associated with EBV infection.¹⁹ This patient received chemotherapy be-

cause of CLL progression (6 cycles of fludarabine). Only 1 patient in our series developed an EBV-positive transformed tumor. This patient also received chemotherapy (cyclophosphamide and etoposide) for an incidental seminoma. One previously published case was associated with HHV8.²² Although no immunodeficiency was stated in this case, the HHV8-positive plasmablastic tumor will now rather be classified within the current World Health Organization classification as a solid variant of primary effusion lymphoma.¹ None of our cases showed HHV8 infection. All previously reported cases died 1 to 9 months after transformation (mean 5 mo). In our series, 2 patients are still alive at the last follow-up (3 to 24 mo) with no evidence of disease.

Among the 4 previously published PBL-Ts of CLL-transformed patients, only 2 cases were probably clonally related, because both tumors exhibited the same light-chain restriction, although molecular studies for immunoglobulin gene rearrangements were not performed. Two PBL-T tumors in our series were clonally related by light-chain expression, but only in 1 case immunoglobulin gene rearrangement could be studied. This case displayed unmutated immunoglobulin gene in both tumors. Unmutated CLL tended to transform to a clonally related high-grade lymphoma.^{39–42} Unmutated immunoglobulin genes are also found in 60% of primary PBLs.⁴³ Two of 3 CLLs and PBL-T tumors displayed deletions of 13q14.3, which are also found in up to 17% of conventional Richter syndrome.⁴⁴ *BCL6* gains were found in all PBL-T tumors evolving from CLL. This is an infrequent genomic alteration found in rare cases of conventional transformation to a diffuse large B-cell lymphoma⁴⁴ but in up to 40% of primary PBLs associated with other copy number alterations.³⁵ Therefore this finding might be due to the presence of an underlying hyperploidy karyotype. None of the FL cases exhibited *BCL6* alterations. All our FL cases transformed to a probably clonally related plasmablastic tumor, as both components exhibited the same light-chain expression and carried the t(14;18) translocation, as also proven in a previous case reported.²⁰ In none of our FL cases DNA was available for immunoglobulin gene sequencing. Although *BCL2* alterations can be found in up to 30% of primary PBLs, none of these tumors harbored the t(14;18) translocation,³⁵

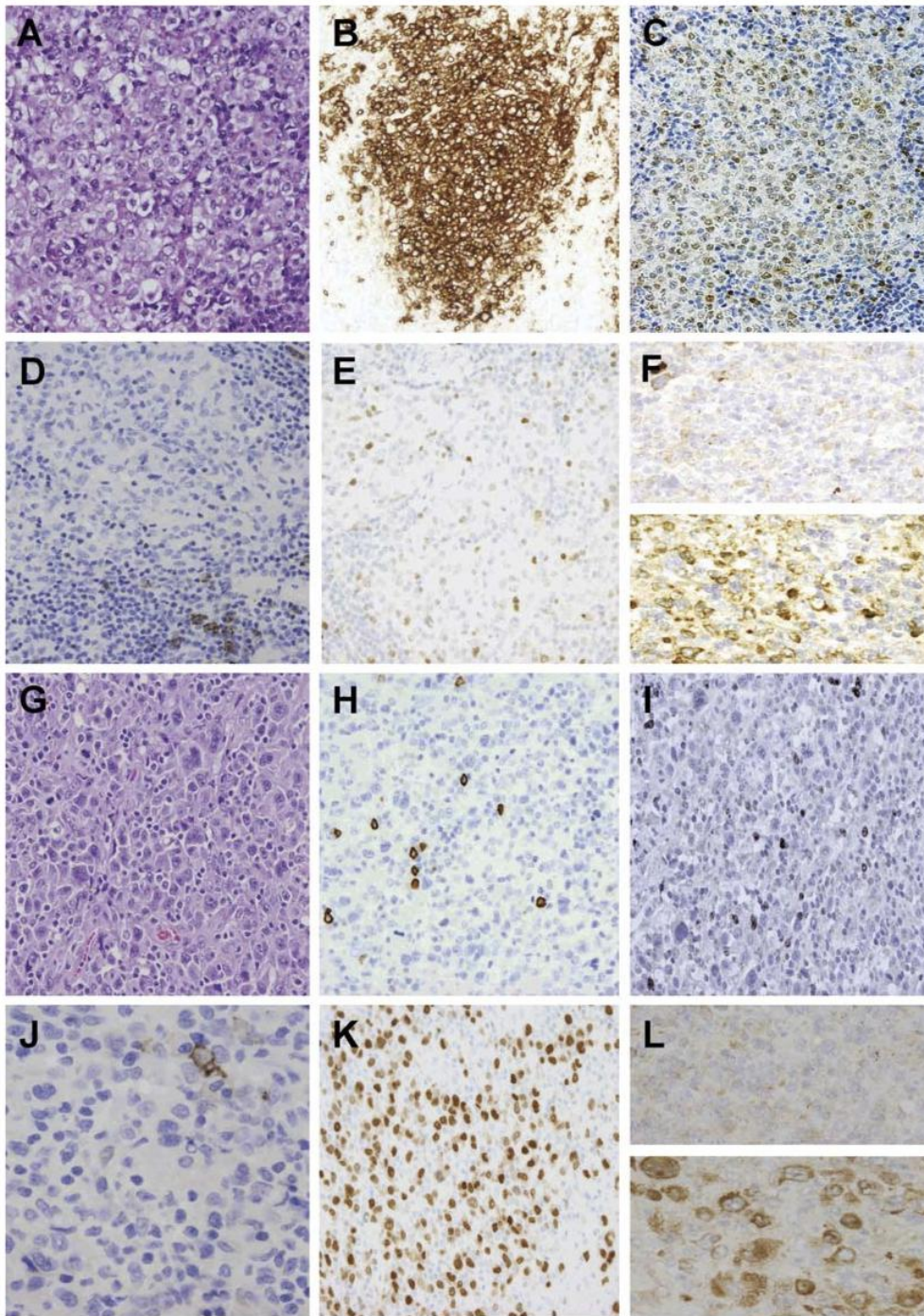


FIGURE 2. Case 4: FL with PBL-T. A, Neoplastic follicles are composed by a predominance of large centroblasts (hematoxylin and eosin) that are positive for (B) CD20 and (C) PAX5. The plasma cell–associated markers (D) 138 and (E) IRF4/MUM1 were negative. F, Tumor cells exhibit cytoplasmic λ light-chain expression (lower panel) being negative for κ (upper panel). G, The PBL-T is composed of large immunoblastic cells, some of them polyploid, with different extents of secretory transformation (hematoxylin and eosin). Tumor cells are negative for the B-cell-associated antigens (H) CD20 and (I) PAX5 and for the plasma cell antigen (J) CD138. K, In contrast, tumor cells were strongly positive for the plasma cell–associated transcription factor IRF4/MUM1. L, Large cells strongly express λ light chain (lower panel) but are negative for κ (upper panel).

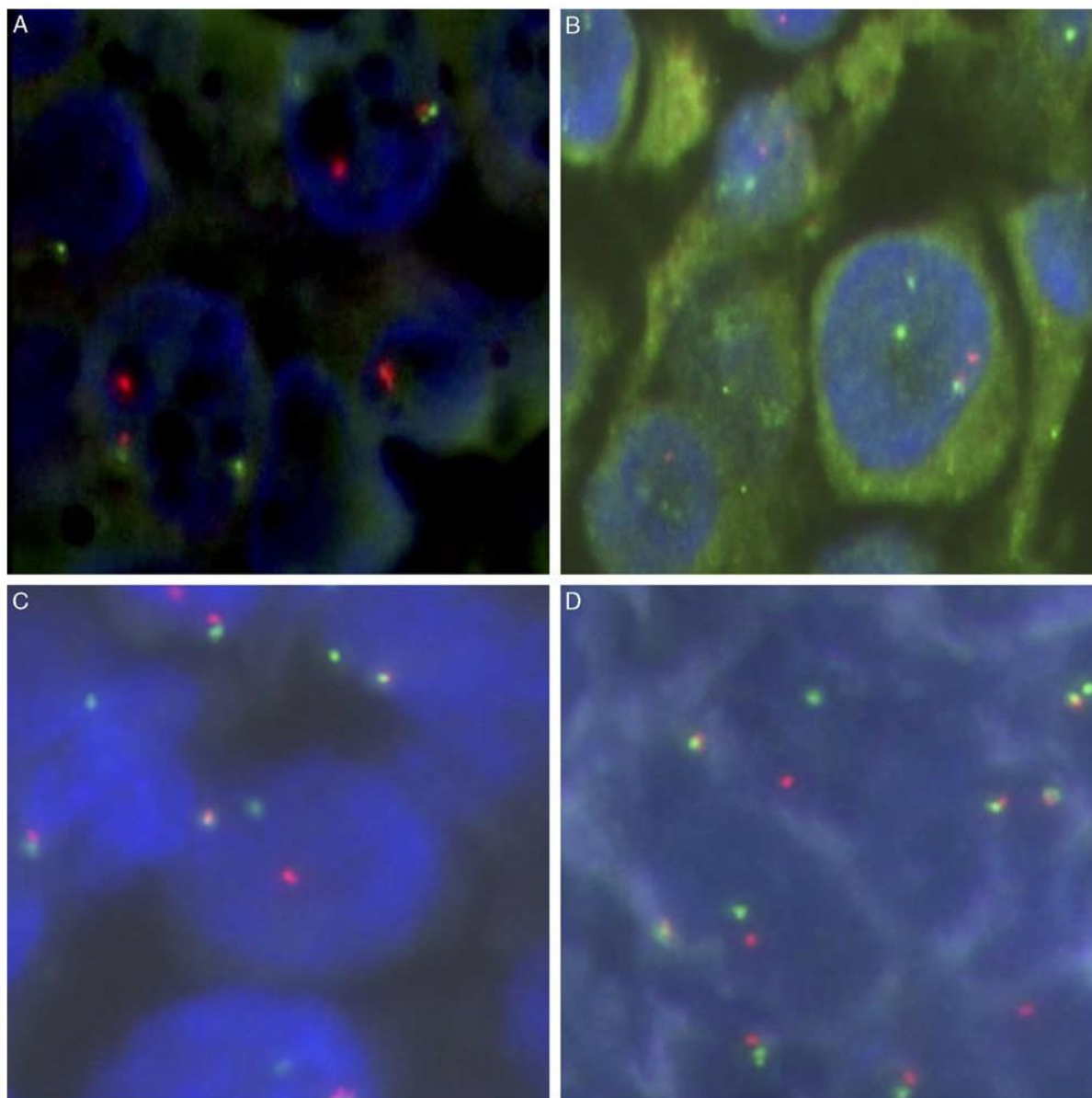


FIGURE 3. FISH study in low-grade lymphomas and transformed tumors. A, Case 1: *MYC* is rearranged in the PBL-T of CLL (break-apart probe *MYC* red, *IGH* green). B, Case 1: *IGH/MYC* translocation is demonstrated in PBL-T (dual-color dual-fusion probe). C, Case 4: *IGH/BCL2* translocation is found in the FL and (D) in the plasmablastic tumor (dual-color dual-fusion probe).

suggesting that they represent different diseases. It is noteworthy that the only previously reported FL case was also proved to be clonally related to the PBL-T tumor, and the t(14;18) translocation was present in both components.²⁰ Moreover this case also displayed an *MYC* translocation, although the partner could not be demonstrated.

Recent evidence suggests that deregulation of *MYC* gene expression through translocation (43%) or amplification (20%) of the *MYC* gene region may be important in the pathogenesis of PBLs.^{30,35} *MYC* translocation is

more common in EBV-positive (74%) than EBV-negative (43%) tumors and is associated with poorer overall survival.³⁵ In our series, 2 patients (30%) harbored a *MYC* rearrangement and evolved from CLL. *MYC* alterations are found in 25% of the transformed CLLs in conventional Richter syndrome.⁴⁵

Five of our 6 patients received a CHOP-like regimen after transformation that included rituximab, although rituximab is no longer recommended, as these tumors are CD20 negative.⁴⁶ In primary PBLs, the current National Comprehensive Cancer Network guidelines recommend

primary treatment with intensive regimens such as CODOX-M/IVAC, EPOCH, or hyperCVAD.⁴⁷

In conclusion, we report a series of PBL-Ts of low-grade B-cell lymphomas. Although these transformed tumors may mimic primary PBL, they are not associated with immunodeficiency and rarely present EBV infection or *MYC* alterations. Moreover, they display genetic features such as the t(14;18) translocation or the 13q deletions that are more characteristic of clonal evolution from a low-grade lymphoma rather than a PBL. Our study demonstrates that a plasmablastic phenotype can be acquired in the evolution of low-grade B-cell lymphomas and expands the clinicopathologic spectrum of the histologic transformation.

REFERENCES

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2008.
2. Muller-Hermelink HK, Zettl A, Pfeifer W, et al. Pathology of lymphoma progression. *Histopathology*. 2001;38:285–306.
3. Mukhopadhyay S, Readling J, Cotter PD, et al. Transformation of follicular lymphoma to Burkitt-like lymphoma within a single lymph node. *Hum Pathol*. 2005;36:571–575.
4. Natkunam Y, Warnke RA, Zehnder JL, et al. Blastic/blastoid transformation of follicular lymphoma: immunohistologic and molecular analyses of five cases. *Am J Surg Pathol*. 2000;24:525–534.
5. Gradowski JF, Jaffe ES, Warnke RA, et al. Follicular lymphomas with plasmacytic differentiation include two subtypes. *Mod Pathol*. 2010;23:71–79.
6. Jourdan F, Molina TJ, Le TA, et al. Florid marginal zone differentiation in follicular lymphoma mimicking marginal zone lymphoma of MALT type in the lung. *Histopathology*. 2006;49:426–429.
7. Nemes Z, Thomazy V, Szeifert G. Follicular centre cell lymphoma with alpha heavy chain disease. A histopathological and immunohistological study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1981;394:119–132.
8. Schmid U, Karow J, Lennert K. Follicular malignant non-Hodgkin's lymphoma with pronounced plasmacytic differentiation: a plasmacytoma-like lymphoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1985;405:473–481.
9. Vago JF, Hurtubise PE, Redden-Borowski MM, et al. Follicular center-cell lymphoma with plasmacytic differentiation, monoclonal paraprotein, and peripheral blood involvement. Recapitulation of normal B-cell development. *Am J Surg Pathol*. 1985;9:764–770.
10. Frizzera G, Anaya JS, Banks PM. Neoplastic plasma cells in follicular lymphomas. Clinical and pathologic findings in six cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1986;409:149–162.
11. Carlsson M, Totterman TH, Matsson P, et al. Cell cycle progression of B-chronic lymphocytic leukemia cells induced to differentiate by TPA. *Blood*. 1988;71:415–421.
12. Gordon J, Mellstedt H, Aman P, et al. Phenotypic modulation of chronic lymphocytic leukemia cells by phorbol ester: induction of IgM secretion and changes in the expression of B cell-associated surface antigens. *J Immunol*. 1984;132:541–547.
13. Okamura J, Letarte M, Stein LD, et al. Modulation of chronic lymphocytic leukemia cells by phorbol ester: increase in Ia expression, IgM secretion and MLR stimulatory capacity. *J Immunol*. 1982;128:2276–2280.
14. Segel GB, Woodlock TJ, Xu J, et al. Early gene activation in chronic leukemic B lymphocytes induced toward a plasma cell phenotype. *Blood Cells Mol Dis*. 2003;30:277–287.
15. Totterman TH, Nilsson K, Sundstrom C. Phorbol ester-induced differentiation of chronic lymphocytic leukaemia cells. *Nature*. 1980;288:176–178.
16. Evans HL, Polski JM, Deshpande V, et al. CD5+ true SLL/CLL with plasmacytic differentiation and an unusual 1p36 translocation: case report and review of the literature. *Leuk Lymphoma*. 2000;39:625–632.
17. Wong KF, So CC, Chan JC, et al. Gain of chromosome 3/3q in B-cell chronic lymphoproliferative disorder is associated with plasmacytoid differentiation with or without IgM overproduction. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002;136:82–85.
18. Perez-Galan P, Mora-Jensen H, Weniger MA, et al. Bortezomib resistance in mantle cell lymphoma is associated with plasmacytic differentiation. *Blood*. 2011;117:542–552.
19. Foo WC, Huang Q, Sebastian S, et al. Concurrent classical Hodgkin lymphoma and plasmablastic lymphoma in a patient with chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma treated with fludarabine: a dimorphic presentation of iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorder with evidence suggestive of multiclonal transformability of B cells by Epstein-Barr virus. *Hum Pathol*. 2010;41:1802–1808.
20. Ouansafi I, He B, Fraser C, et al. Transformation of follicular lymphoma to plasmablastic lymphoma with c-myc gene rearrangement. *Am J Clin Pathol*. 2010;134:972–981.
21. Pines A, Ben-Bassat I, Selzer G, et al. Transformation of chronic lymphocytic leukemia to plasmacytoma. *Cancer*. 1984;54:1904–1907.
22. Ramalingam P, Nayak-Kapoor A, Reid-Nicholson M, et al. Plasmablastic lymphoma with small lymphocytic lymphoma: clinico-pathologic features, and review of the literature. *Leuk Lymphoma*. 2008;49:1999–2002.
23. Robak T, Urbanska-Rys H, Strzelecka B, et al. Plasmablastic lymphoma in a patient with chronic lymphocytic leukemia heavily pretreated with cladribine (2-CdA): an unusual variant of Richter's syndrome. *Eur J Haematol*. 2001;67:322–327.
24. Avet-Loiseau H, Gerson F, Magrangeas F, et al. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood*. 2001;98:3082–3086.
25. Colomo L, Loong F, Rives S, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic differentiation represent a heterogeneous group of disease entities. *Am J Surg Pathol*. 2004;28:736–747.
26. Gabrea A, Martelli ML, Qi Y, et al. Secondary genomic rearrangements involving immunoglobulin or MYC loci show similar prevalences in hyperdiploid and nonhyperdiploid myeloma tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47:573–590.
27. Lee CK, Ma ES, Shek TW, et al. Plasmablastic transformation of multiple myeloma. *Hum Pathol*. 2003;34:710–714.
28. Montes-Moreno S, Gonzalez-Medina AR, Rodriguez-Pinilla SM, et al. Aggressive large B-cell lymphoma with plasma cell differentiation: immunohistochemical characterization of plasmablastic lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with partial plasmablastic phenotype. *Haematologica*. 2010;95:1342–1349.
29. Shou Y, Martelli ML, Gabrea A, et al. Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:228–233.
30. Taddese-Heath L, Meloni-Ehrig A, Scheerle J, et al. Plasmablastic lymphoma with MYC translocation: evidence for a common pathway in the generation of plasmablastic features. *Mod Pathol*. 2010;23:991–999.
31. Vega F, Chang CC, Medeiros LJ, et al. Plasmablastic lymphomas and plasmablastic plasma cell myelomas have nearly identical immunophenotypic profiles. *Mod Pathol*. 2005;18:806–815.
32. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17:2257–2317.
33. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348:1764–1775.
34. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343:1910–1916.
35. Valera A, Balague O, Colomo L, et al. IG/MYC rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:1686–1694.
36. Delecluse HJ, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, et al. Plasmablastic lymphomas of the oral cavity: a new entity associated with the human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 1997;89:1413–1420.

37. Banks PM, Keller RH, Li CY, et al. Malignant lymphoma of plasmablastic identity. A neoplasm with both "immunoblastic" and plasma cellular features. *Am J Med.* 1978;64:906–909.
38. Balague O, Mozos A, Martinez D, et al. Activation of the endoplasmic reticulum stress-associated transcription factor x box-binding protein-1 occurs in a subset of normal germinal-center B cells and in aggressive B-cell lymphomas with prognostic implications. *Am J Pathol.* 2009;174:2337–2346.
39. Gine E, Martinez A, Villamor N, et al. Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia ("accelerated" chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica.* 2010;95:1526–1533.
40. Mao Z, Quintanilla-Martinez L, Raffeld M, et al. IgVH mutational status and clonality analysis of Richter's transformation: diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma in association with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) represent 2 different pathways of disease evolution. *Am J Surg Pathol.* 2007;31:1605–1614.
41. Rossi D, Cerri M, Capello D, et al. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol.* 2008;142:202–215.
42. Timar B, Fulop Z, Csernus B, et al. Relationship between the mutational status of VH genes and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma in Richter's syndrome. *Leukemia.* 2004;18:326–330.
43. Gaidano G, Cerri M, Capello D, et al. Molecular histogenesis of plasmablastic lymphoma of the oral cavity. *Br J Haematol.* 2002;119:622–628.
44. Bea S, Lopez-Guillermo A, Ribas M, et al. Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). *Am J Pathol.* 2002;161:957–968.
45. Rossi D, Spina V, Deambrogi C, et al. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood.* 2011;117:3391–3401.
46. Johnson NA, Boyle M, Bashashati A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood.* 2009;113:3773–3780.
47. Zelenetz AD, Abramson JS, Advani RH, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: non-Hodgkin's lymphomas. *J Natl Compr Cancer Netw.* 2010;8:288–334.

Segundo Trabajo

Resumen

El linfoma folicular (FL) es uno de los linfomas más frecuentes. La translocación $t(14;18)(q32;q21)$ se encuentra en un 80% de los casos y juega un papel importante en linfomagénesis. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo y la transformación de este linfoma no están completamente establecidos. Recientemente se han descrito mutaciones en los genes *NOTCH1* y *NOTCH2* en una variedad de linfomas B, pero la presencia de las mismas y el papel que poseen en la patogenia en el FL son desconocidos.

En este estudio se ha investigado el estado mutacional de estos dos genes en 112 linfomas foliculares. Se identificaron mutaciones en *NOTCH1* en cinco casos, y mutaciones de *NOTCH2* en dos casos (total de 7/112, 6.3%). Todas las mutaciones predecían para una proteína truncada en el dominio PEST, y eran idénticas a otras identificadas en otros linfomas B y CLL.

Los FL con mutación de *NOTCH* se caracterizaban por tener una baja frecuencia de la $t(14;18)$ (14% vs 69%, $p=0.01$), mayor incidencia de afectación esplénica (71% vs 25%, $p=0.02$) y un predominio en mujeres (100% vs 55%, $p=0.04$). Además, se identificó más frecuentemente un componente de linfoma difuso de célula grande (DLBCL) en los FL con mutaciones de *NOTCH* en comparación a los FL no mutados (57% vs 18%, $p=0.03$).

Estos resultados indican que las mutaciones de *NOTCH* son poco frecuentes en el FL. Sin embargo se hallan presentes en un pequeño grupo de casos que presentan características clínico-patológicas distintivas.

Recurrent mutations of *NOTCH* genes in follicular lymphoma identify a distinctive subset of tumours

Kenosuke Karube,¹# Daniel Martínez,¹# Cristina Royo,¹ Alba Navarro,¹ Magda Pinyol,¹ Maite Cazorla,¹ Paola Castillo,¹ Alexandra Valera,¹ Anna Carrió,¹ Dolors Costa,¹ Dolors Colomer,¹ Andreas Rosenwald,² German Ott,³ Daniel Esteban,¹ Eva Giné,¹ Armando López-Guillermo¹ and Elias Campo¹*

¹ Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Spain

² Institute of Pathology, University of Würzburg, and Comprehensive Cancer Centre Mainfranken (CCCM), Germany

³ Department of Clinical Pathology, Robert-Bosch-Krankenhaus, and Dr Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology, Stuttgart, Germany

*Correspondence to: Elias Campo, Department of Anatomical Pathology, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036-Barcelona, Spain. E-mail: ecampo@clinic.ub.es

#These authors equally contributed to this study.

Abstract

Follicular lymphoma (FL) is one of the most common malignant lymphomas. The t(14;18)(q32;q21) translocation is found in about 80% of cases and plays an important role in lymphomagenesis. However, the molecular mechanisms involved in the development and transformation of this lymphoma are not fully understood. Gain-of-function mutations of *NOTCH1* or *NOTCH2* have recently been reported in several B cell lymphoid neoplasms but the role of these mutations in FL is not known. In this study we investigated the mutational status of these genes in 112 FLs. *NOTCH1* and *NOTCH2* mutations were identified in five and two cases, respectively (total 7/112, 6.3%). All mutations predicted for truncated protein in the PEST domain and were identical to those identified in other B cell lymphoid neoplasms. *NOTCH*-mutated FL cases were characterized by lower frequency of t(14;18) (14% versus 69%, $p = 0.01$), higher incidence of splenic involvement (71% versus 25%, $p = 0.02$) and female predominance (100% versus 55%, $p = 0.04$). A diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) component was more frequently identified in *NOTCH*-mutated FL than in wild-type cases (57% versus 18%, $p = 0.03$). These results indicate that *NOTCH* mutations are uncommon in FL but may occur in a subset of cases with distinctive, characteristic, clinicopathological features.

Copyright © 2014 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: follicular lymphoma; *NOTCH1*; *NOTCH2*; mutation; spleen; transformation

Received 23 May 2014; Revised 30 July 2014; Accepted 14 August 2014

No conflicts of interest were declared.

Introduction

Follicular lymphoma (FL) is one of the most common malignant lymphomas in the world. Lymphoma cells usually express germinal centre B cell markers, such as CD10 and BCL6, and t(14;18)(q32;q21), juxtaposing the *BCL2* gene with the immunoglobulin heavy chain (*IGH*) gene, is detected in about 80% of cases [1]. Although the clinical course is usually indolent, the tumour may become refractory to chemotherapy and 25–35% of FLs transform to aggressive lymphomas [1]. This histological transformation is usually associated with a rapid progressive clinical course with around 1 year overall survival. The mechanisms underlying this process are not fully understood [2,3].

The NOTCH signalling pathway activates various physiological cellular processes, including cell proliferation, differentiation and death [4]. *NOTCH1*,

-2, -3 and -4 have been identified as NOTCH transmembrane receptors composed of three domains: extracellular, transmembrane and intracellular (see supplementary material, Figure S1). The intracellular domain is released to the cytoplasm through the binding of NOTCH ligands. This results in the activation of the NOTCH signalling pathway and induces the expression of various target genes [4]. Until now, mutations of *NOTCH1* and *NOTCH2* have been identified in some haematopoietic malignancies, such as chronic lymphocytic leukaemia (CLL) [5,6], mantle cell lymphoma (MCL) [7,8], splenic marginal zone lymphoma (SMZL) [9,10] and acute T cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma (T-ALL/LBL) [11,12]. Almost all *NOTCH* mutations in CLL, MCL and SMZL are localized in the transactivation (TAD) domain or the PEST domain, resulting in truncating mutations, while the majority of *NOTCH1* mutations of T-ALL/LBL are associated with the heterodimerization

Table 1. Clinicopathological findings of follicular lymphoma with *NOTCH* mutations

Case no.	Clinical findings				<i>NOTCH</i> mutational profile		Morphological diagnosis	Cytogenetics		Immunohistochemistry			
	Age/sex	BM involvement	Splenic involvement	FLIPI	<i>NOTCH1</i>	<i>NOTCH2</i>		t(14;18)	t(3q27)	BCL2	CD10	BCL6	LMO2
1	44/F	Pos	Pos	High	p.P2514fs*4	Neg	FL, grade 2	Pos	NE	Pos	Neg	Pos	Pos
2	67/F	Pos	Pos	High	p.P2514fs*4	Neg	FL, grade 3a + DLBCL	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos
3	28/F	Pos	Pos	High	p.P2514fs*4	Neg	FL, grade 2 + DLBCL	Neg	NE	Pos	Pos	Pos	Pos
4	67/F	Pos	Pos	Intermediate	p.P2514fs*4	Neg	FL, grades 2 and 3b + DLBCL	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg
5	64/F	Neg	Neg	High	p.P2514fs*4	Neg	FL, grade 3a + DLBCL	Neg	Pos ^b	Pos	Neg	Pos	Pos
6	62/F	Pos	Pos	High	Neg	p.R2400*	FL, grade 3a	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
7	70/F	Neg	Neg	High	Neg	p.I2304 fs*9	FL, grade 2 ^a	Neg	ND	NE	NE	Pos	NE

NE, not evaluable; ND, not done; LN, lymph node; BM, bone marrow; FLIPI, Follicular Lymphoma International Prognostic Index; pos, positive; neg, negative.

^aTransformed to DLBCL 1 year after the diagnosis of FL.

^bThe sample from a relapsed lesion showed BCL6 translocation, although FISH for BCL6 was not evaluable for the lesion at diagnosis.

(HD) domain [5–7,9–12]. The truncating mutations of the PEST domain result in the elimination of degradation signals of NOTCH proteins. This prolongs the half-life of the intracellular domain, resulting in higher activation of NOTCH signalling [4,13]. Mature B cell lymphomas with *NOTCH1* or *NOTCH2* mutations usually have more aggressive clinical behaviour [5–8].

The potential role of *NOTCH* mutations in FL is not well known. Genome-sequencing studies have not identified mutations in these genes, but the number of cases examined is limited. Therefore, we analysed *NOTCH1* and *NOTCH2* mutations in a large cohort of FLs to determine whether mutations in these genes may contribute to the pathogenesis and evolution of these tumours.

Materials and methods

Samples

A total of 137 samples from 112 FL patients with frozen material were collected from the pathology files of the Hospital Clínic (Barcelona, Spain). Mutational analyses were performed using frozen samples at diagnosis in 71 patients, at relapse in 34 and in seven patients with no available clinical information. Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) samples were also used for additional mutational analyses of paired sequential samples of two *NOTCH1*- and one *NOTCH2*-mutated cases. Pathological findings of all cases were reviewed and classified according to the current WHO classification. This study was approved by the Ethical Committee of the Hospital Clínic, University of Barcelona. Informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki. DNA was extracted following conventional methods and used for the following molecular pathological analyses.

Immunohistochemistry, genetic and molecular analyses

Immunohistochemical analysis was performed using the FFPE samples and following a panel of antibodies:

CD10 (Dako, Glostrup, Denmark), BCL2 (Dako), BCL6 (Dako), CD21 (Dako), CD23 (Dako), CD35 (Dako), LMO2 (Ventana-Roche, Basel, Switzerland) and p53 (Dako). CD10, BCL6 and LMO2 were considered positive when > 25% of tumour cells were positive. Based on previous reports, the cut-off threshold used to determine p53 and BCL2 expression was 10% and 50%, respectively [14,15].

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) studies were performed using FFPE samples with a procedure previously described [16]. DNA probes for *IGH*–*BCL2* (Abbot Molecular, Abbot Park, IL, USA) and break-apart rearrangement probes for *BCL6* and *MYC* (Abbot) were used. *BCL2/IGH* rearrangement was also analysed, using polymerase chain reaction (PCR) for both the major breakpoint region and the minor cluster region, following the BIOMED2 protocol [17]. G-band chromosome analysis was also performed in some cases (Table 1).

PCR and Sanger sequencing for *NOTCH1* and *NOTCH2*

Amplification by PCR was performed using an AmpliTaqGold DNA Polymerase Kit (Life Technologies, Madrid, Spain) with 50 ng DNA. The reaction mix contained 1× PCR buffers (Life Technologies), 200 μM dNTP mix (Life Technologies), 100 nM forward and reverse primers, 1.5 mM MgCl₂ and 1.25 U AmpliTaq-Gold DNA polymerase (Life Technologies) in a final reaction volume of 50 μl. The PCR products, targeting the PEST domain and most of the TAD domain, include 97% of *NOTCH1* mutations previously described in CLL [18] (see supplementary material, Figure S1). Exons 26 and 27, which accumulate virtually all mutations in the HD domain, were also analysed. The PCR products for *NOTCH2* also covered 92% of known mutations described in SMZL, extranodal marginal zone B cell lymphoma and DLBCL [9,10,19] (see supplementary material, Figure S1). Shorter amplicon PCR primers were specially designed for some cases with FFPE tissue available.

For sequencing, PCR products were cleaned using ExoSAP-IT (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) and sequenced using ABI Prism BigDye terminator v 3.1 (Life Technologies) with 5 pM of each primer. Sequencing reactions were run on an ABI-3730 automated sequencer (Life Technologies). All sequences were examined using Mutations Surveyor DNA Variant Analysis software (Soft Genetics, State College, PA, USA). For allele-specific PCR amplification and sequencing, primers were designed for the deletion of CT dinucleotide (p.P2514fs*4) in *NOTCH1*. Sequences for the primers used are listed in Table S1 (see supplementary material). The sensitivity of our Sanger sequencing technique for the assessment of *NOTCH1* allelic mutations and the allele-specific PCR amplification and sequencing of the p.P2514fs*4 mutation were 10% and 3%, respectively, as established in our previous study [20]. These values were determined using DNA titration experiments, by diluting genomic DNA from mutated samples with an allelic frequency close to 45–50%, according to next-generation sequencing with normal DNA [20].

Analytical methods

Obtained categorical data were compared using Fisher's exact test and two-sided *p* value, while non-parametric tests were used for ordinary data. Results were considered to be statistically significant when *p* < 0.05.

Results

NOTCH mutation in FL

Mutational analyses of *NOTCH1* and *NOTCH2* was performed in 112 FL cases (see supplementary material, Figure S1). This series includes 71 FLs at diagnosis and 34 cases at relapse. No clinical information was available in seven cases. The mutational status was successfully analysed in all cases for *NOTCH1* by Sanger sequencing, and five cases carried the mutation p.P2514fs*4 (Table 1, cases 1–5) and one case showed p.R2263W mutation. The case with this last mutation was not included in the *NOTCH*-mutated case list, because this missense mutation has not been described as pathogenic. To determine whether this mutation could be in other cases at lower allelic frequency, we successfully performed a more sensitive allele-specific PCR for the deletion of this mutation in 105 cases and no additional mutated cases were identified. Exons 26 and exon 27 of *NOTCH1*, including the hot spot in the HD domain, were successfully sequenced in 108 and 104 cases, respectively, and no mutations were identified in any case. Mutational analysis for *NOTCH2* was successfully performed in 103 cases. Two cases showed a non-sense mutation and a frameshift mutation, respectively (p.R2400* and p.I2304fs*9) (Table 1, cases 6 and 7). These mutations lead to the truncation of the PEST domain and are identical to those found in SMZL [9,10].

We additionally found some single nucleotide variants that were located on identified polymorphic sites and then excluded from further studies. In total, *NOTCH1* or *NOTCH2* mutations were identified in seven of the 112 cases (6.3%).

Pathological features of *NOTCH*-mutated FL

The clinicopathological findings of seven FLs with *NOTCH1* or *NOTCH2* mutations are described in Table 1 and Figure 1a–g. In all mutated cases, atypical lymphoid cells had a follicular growth pattern that was highlighted by the immunohistochemical staining of follicular dendritic cells with CD21 and CD23 (Figure 1a, b). Morphologically, three of seven *NOTCH*-mutated cases showed grade 2 or 3a, while the other case had areas of grade 2 and 3b (Table 1). t(14;18) was only identified in one of the seven mutated cases and two had a *BCL6* rearrangement (Table 1). *BCL2* was expressed in lymphoma cells in four cases and was negative in two (Figure 1c, d). CD10, *BCL6* and LMO2, representative germinal centre markers, were expressed in 50%, 86% and 83% of the cases analysed, respectively (Figure 1e–g). The pathological features of the wild-type FL at diagnosis and relapse were relatively similar (see supplementary material, Table S2). Comparison of this group of cases with the seven *NOTCH*-mutated FLs revealed a significantly lower frequency of t(14;18) in the mutated than in the wild-type tumours (14% versus 69%, *p* = 0.01), whereas no significant differences were seen in immunohistochemical findings (CD10, *BCL2* and *BCL6*) (Table 2).

NOTCH mutations and DLBCL transformation

A DLBCL component associated with the FL at the moment of diagnosis was identified in four of the seven (57%) *NOTCH*-mutated cases but only in 12 of the 64 (18%) unmutated tumours (*p* = 0.03). One mutated FL (case 7, Table 1) and five of 64 *NOTCH* wild-type FL cases transformed to DLBCL subsequently. These findings suggest that association with DLBCL is significantly more common in *NOTCH*-mutated than wild-type FLs (71% versus 23%, *p* = 0.02) (Table 3).

Paired sequential biopsies were investigated in 14 patients, including three *NOTCH*-mutated cases (cases 3, 5 and 7 in Table 1) that already had a concomitant DLBCL at diagnosis, and 11 unmutated (see supplementary material, Table S3). Nine cases showed histological transformation from FL to DLBCL, including one *NOTCH*-mutated case (no. 7) and eight wild-type cases. *NOTCH* mutational status did not change between the two sequential samples in all cases analysed, regardless of histological transformation. In addition we studied the presence of the *NOTCH* mutation separately in the FL and simultaneous DLBCL component in the spleen of case 2, and the same mutation was detected in both FL and DLBCL (see supplementary material, Figure S2). These findings suggest that *NOTCH1* mutations in FL may be acquired before the histological transformation occurs.

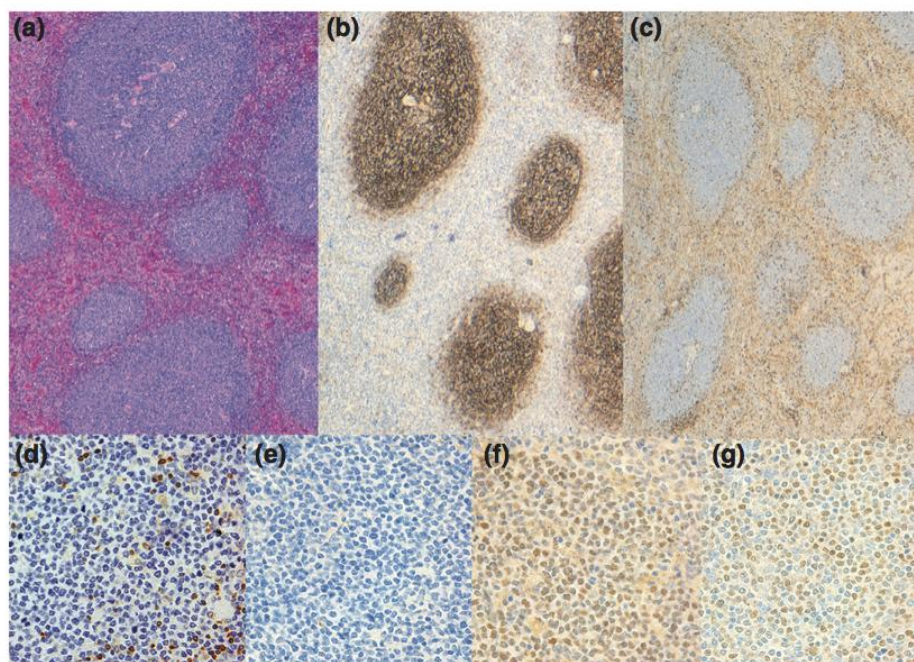


Figure 1. Pathological findings in follicular lymphoma with *NOTCH1* mutation: (a) haematoxylin and eosin (H&E)-stained splenic lesion of case 2 shows nodular proliferation corresponding to follicular structures; (b) immunohistochemistry for CD21 highlights follicular dendritic cell proliferation; (c, d) BCL2 staining is negative in lymphoma cells; (e) CD10 is negative in lymphoma cells, while the germinal centre B cell markers BCL6 (f) and LMO2 (g) are expressed by the lymphoma cells. Magnification = $\times 40$ for H&E, CD21 and BCL2; $\times 400$ for BCL6, CD10, BCL6 and LMO2

Table 2. Pathological characteristics of follicular lymphoma cases with or without *NOTCH* mutations

	<i>NOTCH</i> wild-type in total ($n = 105$)	<i>NOTCH</i> mutated ^a ($n = 7$)	<i>p</i>
Morphology			
Grade 1 or 2	57/105 (54%)	2/7 (29%)	n.s.
Grade 3a or 3b	29/105 (28%)	1/7 (14%)	n.s.
FL + DLBCL	19/105 (18%)	4/7 (57%)	0.03
Immunohistochemistry^b			
CD10	68/85 (80%)	3/6 (50%)	n.s.
BCL2	71/86 (83%)	4/6 (67%)	n.s.
BCL6	59/63 (94%)	6/7 (86%)	n.s.
Chromosomal translocation			
t(14;18)	25/36 (69%)	1/7 (14%)	0.01
t(3q27)	1/4 (25%)	2/4 (50%)	n.s.

n.s., not significant; DLBCL, diffuse large B cell lymphoma.

^aFive and two cases showed *NOTCH1* and *NOTCH2* mutation, respectively.

^bThis indicates a number of positive cases.

To determine the relationship between *NOTCH* mutations and other genetic alterations associated with DLBCL transformation in FL [21,22], we studied TP53 protein expression by immunohistochemistry and *MYC* rearrangements by FISH in 21 *NOTCH* wild-type and five *NOTCH*-mutated FLs with DLBCL. Ten of 20 *NOTCH* wild-type DLBCLs showed strong over-expression of TP53 and two had *MYC* rearrangements. *NOTCH*-mutated FLs with DLBCL were all negative for TP53 ($p = 0.06$) and *MYC* rearrangements (see supplementary material, Table S4).

Clinical findings of *NOTCH*-mutated FL

The clinical characteristics of the seven *NOTCH*-mutated FL and 64 unmutated cases at diagnosis are described in Tables 1 and 3. All *NOTCH*-mutated cases were diagnosed in female patients, six had an extranodal involvement and five (71%) had splenic involvement. Significant differences between wild-type and mutated cases were sex (female proportion 55% versus 100%; $p = 0.04$) and splenic involvement (16% versus 71%; $p = 0.02$). No significant difference was observed in the overall survival of the patients with mutated and unmutated FLs [5 year survival rate, 71% (*NOTCH* mutated) versus 67% (*NOTCH* wild-type)].

Discussion

We have shown that *NOTCH* mutations occur in about 6% of FLs and seem to identify a particular subset of patients characterized by female predominance, frequent splenic involvement, low frequency of t(14;18) and a significant association with DLBCL. The frequency of *NOTCH* mutations in FL is relatively similar to the 4–10% observed in CLL [5,6,23,24] and lower than in MCL (10–12%) [7,8] or SMZL (20–25%) [9,10]. The ratio of *NOTCH1* and *NOTCH2* mutations is different among these diseases. Almost all *NOTCH* mutations in CLL involve *NOTCH1*, whereas *NOTCH2* mutation

Table 3. Clinical characteristics of follicular lymphoma at diagnosis according to *NOTCH* mutational status

Features	<i>NOTCH</i> wild-type (n = 64)	<i>NOTCH</i> mutated (n = 7)	p
Age (median)	56.5 (28.5–89)	65.6 (28–69.6)	n.s.
Gender (female, %)	35 (55%)	7 (100%)	0.04
Clinical stage I–II	10 (16%)	1 (14%)	n.s.
Clinical stage III–IV	52 (84%)	6 (86%)	n.s.
Extranodal involvement	37 (62%)	6 (86%)	n.s.
Bone marrow infiltration	31 (52%)	5 (71%)	n.s.
Splenic involvement	14 (25%)	5 (71%)	0.02
B symptoms	13 (22%)	1 (14%)	n.s.
FLIPI (≥2)	30 (61%)	7 (100%)	n.s.
IPI (≥3)	11 (23%)	2 (50%)	n.s.
LDH (>ULN)	21 (36%)	3 (43%)	n.s.
β2-micro (>ULN)	27 (52%)	3 (75%)	n.s.
Haemoglobin (<120 g/l)	22 (37%)	3 (50%)	n.s.
Treatment			
Wait and see	4 (6%)	0 (0%)	n.s.
CHOP	42 (68%)	5 (71%)	n.s.
Other	16 (26%)	2 (29%)	n.s.
Rituximab	31 (50%)	3 (43%)	n.s.
Response (% CR and PR)	52 (93%)	6 (86%)	n.s.
Relapse and refractory	40 (69%)	3 (43%)	n.s.
DLBCL*	15 (23%)	5 (71%)	0.02
OS months (median, CI 95%)	173 (87–261)	Not reached	n.s.
Survival at 5 years	67% (55–79)	71% (38–100)	
Died	28 (44%)	2 (33%)	–

ULN, upper limit of normal; FLIPI, Follicular Lymphoma International Prognostic Index; CR, complete remission; PR, partial remission; DLBCL, diffuse large B cell lymphoma; n.s., not significant.

*Histologically confirmed DLBCL, either at diagnosis or in the evolution of the disease at follow-up.

is very rare [25]. On the other hand, *NOTCH2* mutations are identified in around 20% of SMZLs, being more frequent than *NOTCH1* (5%) [10]. *NOTCH1* and *NOTCH2* mutations are similarly frequent in MCL (about 5% for both) [8]. In our study *NOTCH1* mutations (five cases) were slightly more frequent than *NOTCH2* mutations (two cases).

The frequency of t(14;18) in *NOTCH*-mutated FL (14%) is significantly lower than in conventional FL (ca. 80%) [1]. Several studies have highlighted the biological and clinical differences of FL with and without t(14;18) [26–29]. Guo *et al* [26] showed that FL cases without t(14;18) had a higher histological grade and a lower frequency of CD10 and BCL2 expression. Leich *et al* [29] identified that the gene expression profile of FL without t(14;18) shared more similarities to activated B cells than germinal centre B cells. FL without t(14;18) also shows different distribution of other genetic alterations. Comprehensive genomic profiles revealed that *BCL6* rearrangement, trisomy 3 and trisomy 18 are more common in FL without t(14;18) [27,29]. Katzenberger *et al* [30] identified frequent deletion of 1p36 in a subtype of t(14;18)-negative FLs with a diffuse growth pattern and frequent clinical presentation as large masses in the inguinal region. The findings of our study suggest that, in addition to the previous genetic alterations, *NOTCH* mutations may contribute to lymphomagenesis and aggressiveness in a subset of t(14;18)-negative FLs.

Splenic involvement is a relatively rare event in FL. Although some cases have been described previously, the molecular abnormalities of these tumours

have not been analysed in detail [31]. In the present study, *NOTCH*-mutated FLs showed significantly more frequent splenic involvement than wild-type cases. *NOTCH2* is essential for B cells to differentiate into marginal zone B (MZB) cells [32]. *NOTCH2* activation also promotes B cells to localize in the splenic marginal zone [33,34], whereas its inhibition induces relocalization of MZB to other organs, such as the peripheral blood, resulting in splenic MZ attenuation. Frequent *NOTCH2* mutation in SMZL suggests that activation of the *NOTCH* pathway may promote lymphoma cell accumulation in the spleen. In this study, four of five cases with splenic involvement showed *NOTCH1* mutation. Although *NOTCH1* is involved in the differentiation of B cells to antibody-secreting cells [35], the association of *NOTCH1* and splenic B cell differentiation remains unknown.

The relationship between *NOTCH2* mutations and SMZL raises the question of whether the *NOTCH*-mutated FL observed in this study could be related to these tumours. The five FLs with *NOTCH* mutations and splenic involvement had a clear follicular growth pattern, highlighted by a well-preserved meshwork of follicular dendritic cells, and they lacked monocytoid differentiation. The five cases expressed germinal centre cell markers, including CD10 in two, BCL6 in four and LMO2 in four. In addition, two cases carried the t(14;18) translocation or BCL6 rearrangement. All these findings support the interpretation of these cases as follicular lymphomas. Further studies are needed to define the role of *NOTCH1* activation and FL pathogenesis in the splenic microenvironment.

NOTCH mutations have been associated with more frequent transformation to DLBCL in CLL and blastoid morphology in MCL [5,6,8], and with poor prognosis in CLL [5,6] and MCL [8]. However, the prognostic significance of *NOTCH2* mutations in SMZL is still controversial [9,10]. In this study, four FLs with *NOTCH* mutations were associated with a simultaneous DLBCL component, and one case of FL grade 2 showed histological transformation to DLBCL at relapse. These findings suggest that *NOTCH* mutations are also associated with histological aggressiveness in FL when compared with the frequency of histological transformation previously described (25–35%) [1]. The prognostic impact of *NOTCH* mutations on FL could not be properly determined in our study, due to the small number of mutated cases. Future analyses with larger numbers of cases may clarify the prognostic significance of *NOTCH* mutations in these patients.

Until now, several molecular mechanisms for the transformation of FL have been described. *MYC* translocation [36], deletions of *CDKN2A* [37] and *TP53* mutations [38] are representative genetic abnormalities related to histological transformation and aggressiveness of FL. In this study, *MYC* and *TP53* status were further analysed to explore the relationship of these mechanisms and *NOTCH* mutations in the histological aggressiveness of FL. Immunohistochemistry for p53 identifies its nuclear accumulation, caused by *TP53*

mutation. In our study, p53 positivity or *MYC* rearrangements were confirmed for DLBCL components in 50% of *NOTCH* wild-type cases, but were not detected in any of the *NOTCH*-mutated cases. This indicates that *NOTCH* mutations might be an alternative mechanism to *TP53* alterations or *MYC* rearrangement in the histological aggressiveness of FL. On the other hand, *NOTCH1* mutations have been reported to be occasionally associated with *TP53* mutations in MCL [7]. Fabbri *et al* [5] described that *NOTCH1* mutation and *MYC* translocation were mutually exclusive in Richter's transformation in CLL, whereas both were sometimes accompanied by *TP53* mutation. Recently, Pasqualucci *et al* [39] and Okosun *et al* [40] have described that mutations of regulator genes of the NF- κ B pathway (*MYD88* and *TNFAIP3*) are also involved in the histological transformation. The pathological association between these genetic abnormalities and *NOTCH* mutation should be explored in the future.

NOTCH mutational status was analysed in paired sequential samples in 14 patients, including three *NOTCH*-mutated cases and nine transformed cases. *NOTCH* mutational status did not change between the sequential samples in all cases analysed, regardless of histological transformation (see supplementary material, Table S3). In one case in which we could separately examine the *NOTCH1* mutation in the FL and the concomitant DLBCL, we found the same mutations in both components. These findings suggest that *NOTCH1* mutation may already be present in the initial FL component and may facilitate the progression to DLBCL. Villamor *et al* [20] performed sequential analysis on 200 patients, and only one case (0.5%) acquired *NOTCH1* mutation. Fabbri *et al* [5] also analysed *NOTCH1* mutation in paired sequential samples collected before and after the Richter's transformation of CLL. A majority of cases showed *NOTCH1* mutation in the leukaemic cells of CLL before the transformation. These findings share similarities with *NOTCH*-mutated FL cases analysed in this study.

The *NOTCH* mutations identified in this study may open new possibilities in the therapy of FL. γ -Secretase activates the *NOTCH* pathway by cleaving the transmembrane domain, followed by releasing the intracellular domain into the cytoplasm. γ -Secretase inhibitors (GSIs) have been assessed as a possible therapy in *NOTCH*-mutated tumours and could be also effective in FLs carrying these mutations. GSI suppressed cell proliferation or induced apoptosis in MCL cell lines with the *NOTCH1* mutation p.P2514fs*4, also identified in our FLs [7]. Although several points still remain to be improved for the clinical usage of GSI, especially in efficacy, recent reports have indicated that the modulation of the dose or combination therapies with other drugs, including glucocorticoids, might increase the anti-tumour effect and reduce the toxicity [41,42]. Therapeutic antibodies targeting individual Notch receptors may be interesting therapeutic alternatives targeting this pathway [43].

In conclusion, the present study shows that *NOTCH1* or *NOTCH2* are mutated in 6.3% of FLs. These cases have particular biological features, characterized by low frequency of t(14;18), common splenic involvement and frequent association with DLBCL. Further analyses are required to clarify the functional contribution of *NOTCH* mutation to FL lymphomagenesis and its potential relevance as a new therapeutic target.

Acknowledgements

The authors are deeply grateful to Sara Guijarro, Laura Gelabert, Raquel Bermudo and Ingrid Victoria for their excellent technical assistance and discussion and to Liza Cox for English editing. This work was supported by the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT; Grant No. SAF12-38432) and the Generalitat de Catalunya (Grant No. 2009SGR992); EC is an ICREA-Academia researcher of the Generalitat de Catalunya; KK receives a research fellowship from the Uehara Memorial Foundation, Japan; and DM is supported by Instituto de Salud Carlos III, 'Contratos de Formación en Investigación Río Hortega' (Grant No. CM12/00054).

Author contributions

KK, DM and EC analysed data and wrote the manuscript; KK, DM, PC and EC conducted the pathological review; CR, AN, MC and MP performed mutational analyses; EG, DE and ALG performed clinical analyses; AV, DCosta and AC performed FISH analyses; DColomer performed PCR to detect genetic rearrangement or confirm clonality; AR and GO provided samples and analysed data; and EC designed and supervised the experiments.

References

1. Swerdlow S, Campo E, Harris N, *et al*. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, 4th edn. IARC Press: Lyon, 2009.
2. Lossos IS, Gascoyne RD. Transformation of follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011; **24**: 147–163.
3. Davies AJ, Rosenwald A, Wright G, *et al*. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma proceeds by distinct oncogenic mechanisms. *Br J Haematol* 2007; **136**: 286–293.
4. Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 2009; **137**: 216–233.
5. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, *et al*. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of *NOTCH1* mutational activation. *J Exp Med* 2011; **208**: 1389–1401.
6. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, *et al*. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011; **475**: 101–105.
7. Kridel R, Meissner B, Rogic S, *et al*. Whole transcriptome sequencing reveals recurrent *NOTCH1* mutations in mantle cell lymphoma. *Blood* 2012; **119**: 1963–1971.

8. Bea S, Valdes-Mas R, Navarro A, *et al.* Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: 18250–18255.
9. Kiel MJ, Velusamy T, Betz BL, *et al.* Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic *NOTCH2* mutations in splenic marginal zone lymphoma. *J Exp Med* 2012; **209**: 1553–1565.
10. Rossi D, Trifonov V, Fangazio M, *et al.* The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of *NOTCH2* and other pathways regulating marginal zone development. *J Exp Med* 2012; **209**: 1537–1551.
11. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, *et al.* Activating mutations of *NOTCH1* in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004; **306**: 269–271.
12. Malecki MJ, Sanchez-Irizarry C, Mitchell JL, *et al.* Leukemia-associated mutations within the *NOTCH1* heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 4642–4651.
13. Fryer CJ, White JB, Jones KA. Mastermind recruits Cdc2/CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Mol Cell* 2004; **16**: 509–520.
14. Valera A, Lopez-Guillermo A, Cardesa-Salzman T, *et al.* MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica* 2013; **98**: 1554–1562.
15. Agostinelli C, Paterson JC, Gupta R, *et al.* Detection of LIM domain only 2 (LMO2) in normal human tissues and haematopoietic and non-haematopoietic tumours using a newly developed rabbit monoclonal antibody. *Histopathology* 2012; **61**: 33–46.
16. Kuchinka BD, Kalousek DK, Lomax BL, *et al.* Interphase cytogenetic analysis of single cell suspensions prepared from previously formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol* 1995; **8**: 183–186.
17. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98–3936. *Leukemia* 2003; **17**: 2257–2317.
18. Lopez C, Delgado J, Costa D, *et al.* Different distribution of *NOTCH1* mutations in chronic lymphocytic leukemia with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; **51**: 881–889.
19. Lee SY, Kumano K, Nakazaki K, *et al.* Gain-of-function mutations and copy number increases of *Notch2* in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci* 2009; **100**: 920–926.
20. Villamor N, Conde L, Martinez-Trillos A, *et al.* *NOTCH1* mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* 2013; **27**: 1100–1106.
21. Sander CA, Yano T, Clark HM, *et al.* *p53* mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 1993; **82**: 1994–2004.
22. Takimoto Y, Takafuta T, Imanaka F, *et al.* Histological progression of follicular lymphoma associated with *p53* mutation and rearrangement of the *C-MYC* gene. *Hiroshima J Med Sci* 1996; **45**: 69–73.
23. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, *et al.* *NOTCH1* mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* 2012; **119**: 329–331.
24. Strefford JC, Sutton LA, Baliakas P, *et al.* Distinct patterns of novel gene mutations in poor-prognostic stereotyped subsets of chronic lymphocytic leukemia: the case of SF3B1 and subset #2. *Leukemia* 2013; **27**: 2196–2199.
25. Fabbri G, Khiabani H, Holmes AB, *et al.* Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *J Exp Med* 2013; **210**: 2273–2288.
26. Guo Y, Karube K, Kawano R, *et al.* Low-grade follicular lymphoma with t(14;18) presents a homogeneous disease entity otherwise the rest comprises minor groups of heterogeneous disease entities with *Bcl2* amplification, *Bcl6* translocation or other gene aberrances. *Leukemia* 2005; **19**: 1058–1063.
27. Tagawa H, Karube K, Guo Y, *et al.* Trisomy 3 is a specific genomic aberration of t(14;18) negative follicular lymphoma. *Leukemia* 2007; **21**: 2549–2551.
28. Karube K, Ying G, Tagawa H, *et al.* *BCL6* gene amplification/3q27 gain is associated with unique clinicopathological characteristics among follicular lymphoma without *BCL2* gene translocation. *Mod Pathol* 2008; **21**: 973–978.
29. Leich E, Salaverria I, Bea S, *et al.* Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood* 2009; **114**: 826–834.
30. Katzenberger T, Kalla J, Leich E, *et al.* A distinctive subtype of t(14;18)-negative nodal follicular non-Hodgkin lymphoma characterized by a predominantly diffuse growth pattern and deletions in the chromosomal region 1p36. *Blood* 2009; **113**: 1053–1061.
31. Mollejo M, Rodriguez-Pinilla MS, Montes-Moreno S, *et al.* Splenic follicular lymphoma: clinicopathologic characteristics of a series of 32 cases. *Am J Surg Pathol* 2009; **33**: 730–738.
32. Pillai S, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol* 2009; **9**: 767–777.
33. Simonetti G, Carette A, Silva K, *et al.* IRF4 controls the positioning of mature B cells in the lymphoid microenvironments by regulating *NOTCH2* expression and activity. *J Exp Med* 2013; **210**: 2887–2902.
34. Witt CM, Won WJ, Hurez V, *et al.* *Notch2* haploinsufficiency results in diminished B1 B cells and a severe reduction in marginal zone B cells. *J Immunol* 2003; **171**: 2783–2788.
35. Santos MA, Sarmento LM, Rebelo M, *et al.* Notch1 engagement by δ -like-1 promotes differentiation of B lymphocytes to antibody-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 15454–15459.
36. Yano T, Jaffe ES, Longo DL, *et al.* MYC rearrangements in histologically progressed follicular lymphomas. *Blood* 1992; **80**: 758–767.
37. Elenitoba-Johnson KS, Gascoyne RD, Lim MS, *et al.* Homozygous deletions at chromosome 9p21 involving p16 and p15 are associated with histologic progression in follicle center lymphoma. *Blood* 1998; **91**: 4677–4685.
38. Davies AJ, Lee AM, Taylor C, *et al.* A limited role for *TP53* mutation in the transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2005; **19**: 1459–1465.
39. Pasqualucci L, Khiabani H, Fangazio M, *et al.* Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Rep* 2014; **6**: 130–140.
40. Okosun J, Bodor C, Wang J, *et al.* Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat Genet* 2014; **46**: 176–181.
41. Real PJ, Tosello V, Palomero T, *et al.* γ -Secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 2009; **15**: 50–58.
42. Tosello V, Ferrando AA. The NOTCH signaling pathway: role in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia and implication for therapy. *Therap Adv Hematol* 2013; **4**: 199–210.
43. Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, *et al.* Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature* 2010; **464**: 1052–1057.

Tercer Trabajo

Resumen

El linfoma esplénico difuso de la pulpa roja (SDRPL) está considerado como una neoplasia indolente primariamente esplenomegálica y cuya patogénesis no se halla establecida. Ello deriva en parte de las dificultades en su diagnóstico debido a la baja incidencia y las dificultades en la obtención de tejido linfoide útil para el diagnóstico.

En este trabajo se han investigado las alteraciones moleculares y genéticas de 19 SDRPL, todos ellos caracterizados de forma exhaustiva mediante histología del bazo y su posible correlación con la progresión de la enfermedad.

La histología se caracterizaba por la presencia de infiltrados linfoides difusos, que afectaban predominantemente a la pulpa roja, compuestos por una población monótona de células B con un inmunofenotipo inespecífico.

El patrón de mutaciones de *IGHV*, similar a otros linfomas B, fue heterogéneo hallándose mutaciones en el 69% de los casos (9/13). No se identificó un uso preferencial de una familia de *VH*. Los estudios genéticos mediante citogenética convencional y FISH identificaron cariotipos complejos en dos casos y reordenamientos de *IGH* en tres, con *PAX5* y potencialmente *TCL1* como parejas, en un caso cada uno. Los *arrays* de *copy number* mostraron aberraciones en el 69% de los tumores, incluyendo pérdidas recurrentes en 10q23, 14q31-q32 y 17p13 en tres casos, y 9p21 en dos casos. Las deleciones de 7q31.3-q32.3 se identificaron solamente en un caso, mientras que no se detectaron trisomías de los cromosomas 3 ni 18. Se encontraron mutaciones en *NOTCH1* (2 casos) y *MAP2K1* (2 casos), mientras que los genes *BRAF*, *TP53* y *SF3B1* estaban mutados en un caso cada uno. No se encontraron mutaciones de *NOTCH2* o *MYD88*.

Cinco pacientes mostraron progresión de la enfermedad. Cuatro de los cinco pacientes con enfermedad agresiva tenían mutaciones de *NOTCH1* (dos casos), *TP53* (un caso) y *MAP2K1* (un caso). La supervivencia libre de

progresión de los pacientes con genes mutados fue significativamente más corta que en los no mutados ($p=0.011$).

El SDRPL muestra mutaciones en varios genes que se hallan involucrados en las vías de señalización de NF κ B, de BRAF-MEK-ERK y de reparación del DNA, y al igual que en otros linfomas de bajo grado, como el SMZL y la CLL, no se han hallado mutaciones recurrentes, a diferencia de lo que ocurre en la tricoleucemia o en el linfoma linfoplasmacítico.

En conclusión, alteraciones citogenéticas y moleculares que son recurrentes en otros linfomas primariamente esplénicos, tales como del7q31, mutaciones de *NOTCH2* en el SMZL o mutaciones de *MYD88* en el linfoma linfoplasmacítico, se hallan prácticamente ausentes en el SDRPL lo cual apoyaría que el SDRPL es una entidad con rasgos moleculares diferentes a estos dos linfomas. Las mutaciones de *TP53*, *NOTCH1* y *MAP2K1* se asocian a un curso de la enfermedad más progresivo.

NOTCH1, TP53, and MAP2K1 Mutations in Splenic Diffuse Red Pulp Small B-cell Lymphoma Are Associated With Progressive Disease

Daniel Martinez, MD,*† Alba Navarro, PhD,‡ Alejandra Martinez-Trillos, MD,*
Ricardo Molina-Urra, MD,§ Blanca Gonzalez-Farre, MD,* Itziar Salaverria, PhD,‡
Ferran Nadeu, BSc,‡ Anna Enjuanes, PhD,‡ Guillem Clot,‡ Dolors Costa, PhD,*
Ana Carrio, PhD,* Neus Villamor, MD, PhD,*‡ Dolors Colomer, PhD,*‡
Antonio Martinez, MD, PhD,*† Susanne Bens, MD,|| Reiner Siebert, MD, PhD,||
Andrew Wotherspoon, MD, PhD,¶ Silvia Beà, PhD,‡
Estella Matutes, MD, PhD,* and Elias Campo, MD, PhD*†‡

Abstract: Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma (SDRPL) is considered an indolent neoplasm and its pathogenesis is not well known. We investigated the molecular characteristics of 19 SDRPL patients, 5 of them with progressive disease. *IGHV* genes were mutated in 9/13 (69%). Cytogenetic

and molecular studies identified complex karyotypes in 2 cases, and *IGH* rearrangements in 3, with *PAX5* and potentially *TCL1* as partners in each one of them. Copy number arrays showed aberrations in 69% of the tumors, including recurrent losses of 10q23, 14q31-q32, and 17p13 in 3, and 9p21 in 2 cases. Deletion of 7q31.3-q32.3 was present in only 1 case and no trisomies 3 or 18 were detected. *NOTCH1* and *MAP2K1* were mutated in 2 cases each, whereas *BRAF*, *TP53*, and *SF3B1* were mutated each in single cases. No mutations were found in *NOTCH2* or *MYD88*. Four of the 5 patients with aggressive disease had mutations in *NOTCH1* (2 cases), *TP53* (1 case), and *MAP2K1* (1 case). The progression-free survival of patients with mutated genes was significantly shorter than in the unmutated ($P = 0.011$). These findings show that SDRPL share some mutated genes but not chromosomal alterations, with other splenic lymphomas, that may confer a more aggressive behavior.

Key Words: SDRPL, prognosis, *NOTCH1*, *MAP2K1*, *BRAF*, *SF3B1*, *TP53*

(*Am J Surg Pathol* 2015;00:000–000)

From the *Hospital Clinic, Hematopathology Unit; †Department of Anatomic Pathology, Universitat de Barcelona; ‡Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; §Pathology and Cytopathology Department, Hospital Base Puerto Montt, Puerto Montt, Chile; ||Institute of Human Genetics, Christian-Albrechts-University Kiel and University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel, Germany; and ¶Royal Marsden Hospital, London, UK.

D.M., A.N., S.B., E.M., and E.C. contributed equally.

S.B., E.M., and E.C. designed the study. D.M., R.M.-U., B.G.-F., A.M., A.W., E.M., and E.C. performed the histopathologic analysis. A.N., S.B., F.N., A.E., G.C., D.Col. performed the molecular analysis. A.M.-T. and N.V. contributed to the statistical analysis, collected the clinical data and provided the flow cytometric studies. I.S., D.Cos., A.C., S.Ben., and R.S. contributed to the cytogenetic and FISH studies. D.M., A.N., A.M.-T., S.B., E.M., and E.C. wrote the manuscript that has been approved by all authors.

Partially developed at the Centro Esther Koplowitz, Barcelona, Spain.

Conflicts of Interest and Source of Funding: Supported by the *Plan Nacional SAF12/38432* (E.C.), *Generalitat de Catalunya AGAUR 2014-SGR-795* (E.C.) and *2014-SGR-378* (S.B.), *Fondo de Investigaciones Sanitarias-Instituto de Salud Carlos III* (PI11/01177) (S.B.), *Fundació La Marató de TV3* (781/2013410) (S.B.), *Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer* (RD12/0036/0036) (E.C.), and co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF). E.C. is a researcher of the Academia "Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats" (ICREA). D.M. is supported by *Instituto de Salud Carlos III*, "Contratos de Formación en Investigación Río-Hortega" CM12/00054. The authors have disclosed that they have no significant relationships with, or financial interest in, any commercial companies pertaining to this article.

Correspondence: Elias Campo, MD, PhD, Hematopathology Section, Department of Pathology, Hospital Clinic, Villarroel 170, E3-P5, 08036 Barcelona, Spain (e-mail: ecampo@clinic.ub.es).

Supplemental Digital Content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Website, www.ajsp.com.

Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma (SDRPL) is an uncommon and poorly characterized lymphoma that affects the spleen with a diffuse pattern of involvement of the red pulp. It is characterized by an infiltration of both cords and sinuses by a monomorphic population of small B lymphocytes.¹ Clinically, most patients present with a relatively low-level lymphocytosis with or without villous cells, splenomegaly, rarely B symptoms and lymphadenopathy or hepatomegaly. Patients usually follow an indolent clinical evolution who do not require treatment or only splenectomy.^{2–4} Few cases with progressive disease following splenectomy have been described but the underlying molecular mechanisms involved in the pathogenesis and progression of this disease have not yet been recognized.² There is a clear overlap in the clinical and cytologic features between SDRPL and other splenomegalic small B-cell lymphomas such as

splenic marginal zone lymphoma (SMZL), hairy cell leukemia (HCL), and hairy cell leukemia variant (HCL-v). Distinction between these entities could be difficult, and at present the diagnosis should rely on a constellation of features that includes cytology, immunophenotype and histology.¹

Molecular events described in splenic lymphomas have given insights into their pathogenesis and have shown to be useful for the diagnosis of some entities, particularly HCL where a *BRAF* V600E mutation is detected in the vast majority of cases⁵ and, to some extent, SMZL and HCL-v in which the genes *NOTCH2* and *MAP2K1* appear to be frequently mutated, respectively.⁶⁻⁹ However, these mutations are not restricted to a single disease entity or detected in all cases. Thus, although *BRAF* V600E mutations seem to be characteristic of HCL, they may be absent in a significant minority of cases^{10,11} and also rarely found in unclassifiable splenic lymphomas.¹²

Clinical, pathologic, and cytogenetic information of SDRPL is limited to a few series of few patients and occasional case reports.²⁻⁴ In some of these reports the diagnosis of SDRPL was not based on spleen histology and therefore other primary splenomegalic lymphomas could not be excluded. Furthermore, there is so far no information on the presence of mutations on genes that have been documented in closely related B-cell conditions.

We report for the first time a large series of SDRPL and describe the clinical features, morphology, spleen histology, cytogenetics and molecular genetics including copy number arrays, fluorescence in situ hybridization (FISH), and mutational analyses, and discuss the potential prognostic impact in this lymphoma of recurrently mutated genes seen in other B-cell neoplasms.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Nineteen cases of SDRPL were collected for histology review and molecular analysis. Thirteen cases were selected from the files referred to or diagnosed at the Hematopathology Unit of the Hospital Clinic of Barcelona during the period 2000 to 2014 and the remaining 6 cases were collected from the Histopathology Department of the Royal Marsden Hospital (London, UK). All cases were diagnosed based on the histologic features consistent with SDRPL according to the 2008 WHO classification.¹ Spleen and bone marrow (BM) histology, immunophenotype, and clinical features were used to rule out the diagnosis of other lymphomas involving primarily the spleen, in particular SMZL, HCL, HCL-v, and prolymphocytic leukemia. Splenic tissue was reviewed in all cases, whereas BM trephine biopsies were available in 10. Morphology of the circulating lymphocytes was assessed by 2 experienced hematologists on May-Grünwald-Giemsa stained smears in 9 patients. Flow cytometry studies were carried out in blood lymphocytes in 11 (57%) patients on a CD19⁺ gate with a panel of anti-B-cell

monoclonal antibodies. Informed consent for sample analysis was obtained from all patients in agreement with the Institutional Review Board of Hospital Clinic (Barcelona, Spain) or the referral hospital, according to the guidelines of the local Ethic Committee for samples used for research purposes.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical (IHC) studies were carried out in all samples with a panel of monoclonal and polyclonal antibodies reactive in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections using a peroxidase-labeled detection system, standard antigen retrieval protocols, and an automated immunostainer (Dako Autostainer, Glostrup, Denmark). The clone, source, and conditions of use for all antibodies are listed on a Supplementary Table S1 (Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A315>).

Cytogenetic and FISH Analyses

Conventional cytogenetics was performed on fresh peripheral blood (PB) lymphocytes from 6 patients at the time of diagnosis according to standard methods. FISH analysis for detection of *IGH*, *BCL2*, *BCL3*, *PAX5*, *BCL6*, *BCL10*, *FOXPI*, *CCND1*, *ZFP36L1*, *TCL1*, *MALT1*, and *MYC* rearrangements and 17p13 deletions were performed following standard protocols¹³ (Supplementary Methods, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A315> and Supplementary Table S2, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A315>).

Molecular Analyses

Tumor DNA was obtained from the 19 SDRPL, 16 from formalin-fixed paraffin-embedded tissues, and 3 from frozen tissues.¹⁴ In addition, a second DNA sample from 4 patients was extracted from involved PB using QIAamp DNA kit (Qiagen). Mutational analysis of the following genes *BRAF* (exon 15), *MAP2K1* (exons 2-3), *MYD88* (exon 5), *NOTCH1* and *NOTCH2* (exon 34), *SF3B1* (exons 14-15-16), and *TP53* (exons 4 to 10) was performed by Sanger sequencing. In addition, in 9 cases *TP53* mutations were assessed by using the Access Array/Biomark system (next-generation sequencing technology). The *IG* repertoire and *IGHV* mutational status were studied in 13 patients. Copy number analysis was performed in 16 cases using array-comparative genomic hybridization (aCGH) in SurePrint G3 Human aCGH Microarray 1M (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) and Affymetrix SNP6.0 microarrays (Affymetrix, Santa Clara, CA). Array data have been deposited to GEO under accession GSE64822. Details are described in Supplementary Methods, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A315> and shown in Supplementary Table S3, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A315>.

Statistical Analysis

Progression-free survival was defined as the time from splenectomy to disease progression or death.¹⁵

Progression-free survival was analyzed by the Kaplan-Meier method and the log-rank test was used to compare the difference within different groups. The association of categorical variables was assessed by cross-tabulation and exact Pearson χ^2 tests, and results were considered statistically significant when $P < 0.05$. Statistical tests were performed using PASW Statistics v18.0 software (IBM SPSS Statistics).

RESULTS

Clinical Features

Patients had a male predominance (male/female ratio: 2.3:1) and a median age of 65 years (range, 43 to 79 y). Most patients were asymptomatic and were referred because of the splenomegaly or lymphocytosis detected on a routine examination. At diagnosis 6/9 (67%) patients had lymphocytosis, 3 had thrombocytopenia (platelets $< 100 \times 10^9/L$) and none had severe anemia (Hb $< 100 g/L$). A serum monoclonal band of 36 g/L (IgG λ) was detected in one patient (case 12) and another had a concomitant active infection by hepatitis C virus genotype 1b (case 3). All patients underwent splenectomy after a median time of 5 months (range, 1 to 84 mo) from presentation. This procedure was performed as a therapeutic option due to bulky splenomegaly. At a median follow-up of 33 months (range, 12 to 170 mo) from presentation 13/15 (87%) patients with available follow-up were alive. Details are shown in Table 1.

Pathology

Spleen

The weight of the spleens ranged from 1172 to 3285 g (median 2500 g). In all cases there was a massive lymphoid infiltration of the red pulp with variable degree of effacement of the white pulp. Blood cell lakes were variably observed in 14 (73%) but were only prominent in 3 cases. Focal extramedullary hematopoiesis on the red pulp was seen in 3 cases (16%). White pulp was virtually absent with scanty residual aggregates in 15 cases (79%) and was more preserved in the remaining 4 patients. In some cases, this residual white pulp was only highlighted by IHC showing small nodular lymphoid aggregates of predominantly mature T cells located around the splenic trabeculae and the branching arterial vessels. In 8 cases (42%), residual lymphoid follicles within the white pulp could be identified with CD21 and CD23 immunostaining, whereas in the remaining cases the follicular dendritic cell network was absent. Marginal zone differentiation was not seen. The red pulp neoplastic infiltrate was composed by a monotonous population of small lymphocytes, with round nucleus, compact chromatin and no distinct nucleoli (Fig. 1 and Supplementary Table S4, Supplementary Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A315>). Focal plasmacytic differentiation was present in 12 cases (63%). Large cells were only occasionally seen, but in 1 case large cells were more abundant forming small aggregates (case 14). Most cases (79%) had a very

low mitotic index (< 1 mitotic figures per 10 high-power fields) (Table 1).

Immunophenotype studies showed that the neoplastic lymphoid cells were CD20, CD79a, and/or PAX5 positive and consistently negative for germinal center markers CD10 and BCL6, CD21, CD23, SOX11, CD138, and Annexin A1. Seven cases were IgD positive, 2 of them coexpressing IgM, 7 were IgG positive, and the remaining were not evaluable. All cases were positive for DBA.44 and negative for CD25 (Fig. 1), except one (case 14), which was DBA.44 negative and CD25 positive. This case also coexpressed CD5. Case 2 was weakly positive for cyclin D1 but was negative for the t(11;14)(q13;q32) and for SOX11. Only case 4 was diffuse and strongly positive for p53. Nuclear staining for TCL1 was positive in 5 out of 10 cases. Staining for CD3 and CD5 showed a variable component of T cells within the red pulp ranging from scattered (11 cases) to a moderate (8 cases) T-cell population intermingled with the neoplastic cells. The proliferative index assessed by Ki-67 was generally low, equal, or $< 5\%$ in 10 cases, 20% in case 4, and 30% in case 3 (Supplementary Table S4, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A315>).

PB and BM

Morphologic examination of PB in 5 patients showed the presence of small-sized to medium-sized lymphoid cells with condensed chromatin, regular nuclear outline, no nucleoli, and a basophilic cytoplasm with or without the presence of villi or protrusions. In 1 patient (case 3), a few large cells with less condensed chromatin and 1 or 2 nucleoli were also present in the PB and BM after splenectomy. Immunophenotyping in the PB from 11 patients demonstrated the presence of a clonal B-cell population with immunoglobulin light chain restriction and strong expression of CD19 and CD20. CD5 was positive in 1/11, CD43 in 2/9, CD11c in 2/7, CD103 in 2/7, and all cases were CD25, CD10, and CD23 negative (Table 1).

A BM biopsy was performed in 12 patients and it was affected in all of them. Upon histologic review the pattern of involvement was interstitial in 7 cases, intra-sinusoidal in 2 cases and intertrabecular infiltration in 1 case. The infiltration became diffuse in 2 patients at progression (cases 2 and 3). In 2 cases, BM was reported as involved but the slides were not available for review (Table 1).

Genetic Studies

Conventional cytogenetics of PB was available in 6 cases. Three cases carried normal karyotypes, 1 case (case 1) had a somatic pericentromeric inversion in chromosome 7, inv(7)(p22q32), and 2 cases carried a complex karyotype. Case 3 had 4 structural alterations including a t(9;14)(p13;q32) with *IGH-PAX5* translocation confirmed by FISH (Supplementary Fig. S1, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A315>) and case 14 had multiple rearrangements (Supplementary Table S5, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A315>).

TABLE 1. Clinicopathologic Characteristics of the SDRPL Studied

Case	Age (y)/Sex	WBC ($\times 10^9/L$)*	Lymphocytes ($\times 10^9/L$)*	Immunophenotype	BM Infiltration	Gene Mutation	No. CNA
1	73/F	10.4	7.7	CD20 ⁺⁺⁺ , CD19 ⁺⁺⁺ , CD5 ⁻ , CD23 ⁻ , FMC7 ⁺⁺⁺ , CD103 ⁺ , CD25 ⁻ , CD11c [±] , λ	Interstitial	NOTCH1	6
2	48/M	—	2.0	CD20 ⁺⁺⁺ , CD19 ⁺⁺⁺ , CD5 ⁻ , CD23 ⁻ , CD10 ⁻ , CD25 ⁻ , CD11c ⁻	Sinusoidal	MAP2K1	NA
3	43/M	2.7	0.6	CD20 ⁺⁺⁺ , CD19 ⁺⁺⁺ , CD5 ⁻ , CD10 ⁻ , CD43 ⁻ , CD38 ⁺ , CD103 ⁻ , FMC7 ⁺ , λ	Interstitial	NOTCH1	8
4	53/M	63.0	55.0	CD20 ⁺⁺⁺ , CD19 ⁺⁺⁺ , CD5 ⁻ , CD10 ⁻ , CD43 ⁻ , CD25 ⁻ , CD103 ⁻ , CD11c ⁻	Interstitial	TP53	11
5	65/M	—	—	CD20 ⁺⁺⁺ , CD19 ⁺⁺⁺ , CD5 ⁻ , CD10 ⁻	Involved	—	NA
6	69/M	—	—	—	—	MAP2K1	1
7	60/F	10.1	—	CD20 ⁺⁺⁺ , CD19 ⁺⁺⁺ , CD5 ⁻ , CD10 ⁻ , CD43 ⁺ , CD25 ⁻ , CD103 ⁻ , CD11 ⁻	Interstitial	BRAF	0
8	63/M	—	—	—	—	SF3B1	0
9	45/F	18.0	12.0	CD20 ⁺⁺⁺ , CD19 ⁺⁺⁺ , CD5 ⁻ , CD43 ⁻ , CD10 ⁻ , CD11c ⁺ , CD25 ⁻ , CD103 ⁺ , FMC7 ⁺ , IgG ⁺⁺⁺ , κ	Interstitial	—	6
10	67/M	11.2	3.3	—	—	—	1
11	62/F	—	—	—	—	—	0
12	58/M	7.4	4.1	CD20 ⁺⁺⁺ , CD19 ⁺⁺⁺ , CD5 ⁻ , CD23 ⁻ , FMC7 ⁺⁺ , CD43 ⁻ , CD10 ⁻ , λ	Interstitial	—	0
13	61/M	—	—	—	—	—	1
14	71/M	26.0	22.0	CD20 ⁺⁺⁺ , CD19 ⁺⁺⁺ , CD5 ⁺ , CD23 [±] , CD43 ⁺ , FMC7 ⁻ , CD200 ⁺⁺ , κ	Interstitial	—	30
15	79/M	3.3	1.6	—	Nodular Intertrabecular	—	NA
16	75/F	20.0	—	CD20 ⁺⁺⁺ , CD19 ⁺⁺⁺ , CD5 ⁻ , CD43 ⁻ , CD11c ⁻ , CD25 ⁻ , CD103 ⁻ , CD123 ⁻	—	—	1
17	-/M	42.0	—	—	Sinusoidal	—	0
18	65/M	9.6	—	—	Involved	—	1
19	-/F	—	—	CD20 ⁺⁺⁺ , CD19 ⁺⁺⁺ , CD5 ⁻ , CD43 ⁻ , CD11c ⁻ , CD25 ⁻ , CD103 ⁻ , CD123 ⁻	—	—	1

*At diagnosis time and before any treatment.

— indicates negative; +, positive; CNA, copy number alterations; CR, complete response; F, female; HPF, high-power field; HR, hematological response; M, male; NA, not available; No., number; NR, no response; PR, partial response; R-CHOP, rituximab, cyclophosphamide, vincristine, adriamycin, and prednisone; R-COP, rituximab, cyclophosphamide, vincristine, and prednisone; WBC, white blood cells; κ , kappa restriction; λ , lambda restriction.

PAS/A315 and Supplementary Fig. S2, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A315>).

FISH studies detected a loss of 17p in 3 patients (cases 1, 4, and 14). Eighteen cases were screened for the presence of *IGH* rearrangements. In addition to the case with *IGH-PAX5* translocation, 2 additional cases showed signal patterns suggestive of an *IGH* rearrangement. Possible partner for *IGH* translocations (*BCL2*, *BCL3*, *PAX5*, *BCL10*, *BCL6*, *FOXP1*, *ZFP36L1*, *TCL1*, *MALT1*, and *MYC*) were tested in these cases. Remarkably, only *TCL1* showed breakpoints in 1 case (case 19), in line with its chromosomal imbalance profile. The presence of unbalanced breakpoints in the *IGH* and *TCL1* loci, both in 14q32, point to a potential chromosomal event deregulating *TCL1* in this case.

Eleven out of 16 (69%) cases analyzed by copy number arrays had gains and losses, but no amplifications or homozygous deletions (Fig. 2A, Supplementary Table S5, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A315> and Supplementary Table S6, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/PAS/A316>). Six of the 11 (55%) altered cases had only 1 aberration. The remaining 5 cases had a high number of copy number alterations and 1 patient (case 14) showed

chromothripsis of chromosomes 1, 7, and 15. Overall, no recurrent gains were detected, whereas losses of 17p (including *TP53* gene) and 9p (including *CDKN2A* gene) were detected in 3 and 2 patients, respectively. Other recurrent losses were 10q23 and 14q31-q32 detected in 3 patients each (Fig. 2B) and losses of 12p13.3 and 19q13.2 detected in 2 patients each. Interestingly, only 1 patient had losses at 7q31.3-q32.3. There was no evidence of trisomy 3 or 18 in any case.

Molecular Studies

IGHV mutational analysis was performed in 13 cases (Supplementary Table S5, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A315>). Nine cases showed mutated *IGHV* genes and 4 were unmutated. *IGHV4-34* and *IGHV1-2* were the most used rearrangements, 3 cases each. Mutations in 7 genes were analyzed in both PB and spleen in 4 cases and only in the spleen in the remaining 15 tumors. *TP53* was mutated (p.I255S) in 1 patient with 17p deletion but no mutations were detected in the other 2 tumors with 17p deletions. Two patients had mutations in *NOTCH1*, affecting the *PEST* domain (p.P2448fs*6 and p.P2515fs*4), whereas no mutations were identified in *NOTCH2* in any case. *MAP2K1*

TABLE 1. (continued)

Complex Karyotype	Treatment	Mitosis 10 HPF	Ki-67 (%)	Response	Progression	Time to second line (mo)	Second-line Treatment	Response to Second Line	Follow-up (mo)
Yes	Splenectomy	1	10	HR	Yes	43	Pentostatin	Progression	Dead in progression (49)
NA	Splenectomy	1	5	HR	Yes	24	Cladribine	HR	Alive in HR (35)
Yes	Splenectomy	1	30	NR	Yes	1	R-CHOP	CR	Alive in CR (14)
NA	R-COP	10	20	NR	Yes	1	Splenectomy	Progression	Dead in progression (11)
NA	Splenectomy	1	< 5	HR	Yes	48	Rituximab Cladribine	Progression	Alive in progression (77)
NA	Splenectomy	1	5	HR	No	—	—	—	Alive in HR (33)
No	Splenectomy	< 1	< 5	HR	No	—	—	—	Alive in HR (12)
NA	Splenectomy	1	< 5	HR	No	—	—	—	Alive in HR (30)
No	Splenectomy	< 1	< 5	PR	No	—	—	—	Alive in PR (171)
NA	Splenectomy	1	10	HR	No	—	—	—	Alive in HR (102)
NA	Splenectomy	10	10	NA	—	—	—	—	—
No	Splenectomy	< 1	5	HR	No	—	—	—	Alive in HR (39)
NA	Splenectomy	1	5	NA	—	—	—	—	—
Yes	Splenectomy	4	10	HR	No	—	—	—	Alive in HR (28)
NA	Splenectomy	< 1	< 5	HR	No	—	—	—	Alive in HR (16)
NA	Splenectomy	1	5	NA	—	—	—	—	—
NA	Splenectomy	3	10	HR	No	—	—	—	Alive in HR (47)
NA	Splenectomy	1	5	HR	No	—	—	—	Alive in HR (14)
NA	Splenectomy	1	5	NA	—	—	—	—	—

was mutated in 2 patients (p.K57E and p.K57N). One case had a *BRAF* mutation (p.K601Q) and another had an *SF3B1* mutation (p.P642L) (Fig. 3). We did not find mutations in *MYD88* gene, although 6 cases were not evaluable, neither by Sanger sequencing nor by allele-specific PCR. In case 1, the *NOTCH1* mutation (p.P2448fs*6) was detected only in the PB but not in the spleen. Both were samples at the time of diagnosis, and they were clonally related with the same 6 CNA. The other 3 patients with paired samples (PB and spleen) did not have gene mutations.

Clinical Evolution

Thirteen out of 15 patients in whom follow-up information was available responded to splenectomy. No single patient had adverse events due to the surgical procedure. The 2 nonresponders (cases 3 and 4) and the 3 patients that progressed later (cases 1, 2, and 5) required a second line of treatment after a median time of 24 months (range, 1 to 48 mo) from splenectomy (Table 1). Four out of these 5 patients had gene mutations (2 cases in *NOTCH1*, and *MAP2K1* and *TP53* in 1 case each). Three of these cases had a high genetic complexity with 6, 8, and 11 CNA per case, respectively (cases 1, 3, and 4). The 2 nonresponders (cases 3 and 4) received chemotherapy. Case 3 progressed shortly after splenectomy with B symptoms, lymphocytosis, few circulating large cells and

diffuse BM infiltration and achieved a complete response to R-CHOP (rituximab, cyclophosphamide, vincristine, adriamycin, and prednisone). *NOTCH1* gene was mutated and *PAX5* rearranged in this case. The other patient that progressed (case 4) died shortly after splenectomy due to disease progression and *TP53* was mutated in the spleen. These 2 cases had a high Ki-67 ($\geq 20\%$) in the spleen.

Out of the 3 patients who progressed, case 2 relapsed 24 months after splenectomy with increasing lymphocyte count, diffuse BM infiltration, and mesenteric lymphadenopathy. He achieved a hematological response to cladribine. This patient had an *MAP2K1* mutation. A second patient (case 1) who progressed with cytopenias and BM infiltration 43 months from splenectomy received pentostatin but died with progressive disease. This patient had a *NOTCH1* mutation at diagnosis and *TP53* was deleted but not mutated. The third patient who required treatment (case 5) relapsed 48 months after splenectomy. Rituximab therapy was started but stopped due to an anaphylactic reaction and changed to cladribine. At the last follow-up this patient has progressive disease. There were no mutations in any of the tested genes in this case.

The remaining 10 patients who responded to splenectomy had stable disease and they are on a watch and wait policy. One of these patients, with a follow-up of 33 months had *MAP2K1* mutation, 1 had *SF3B1* mutation

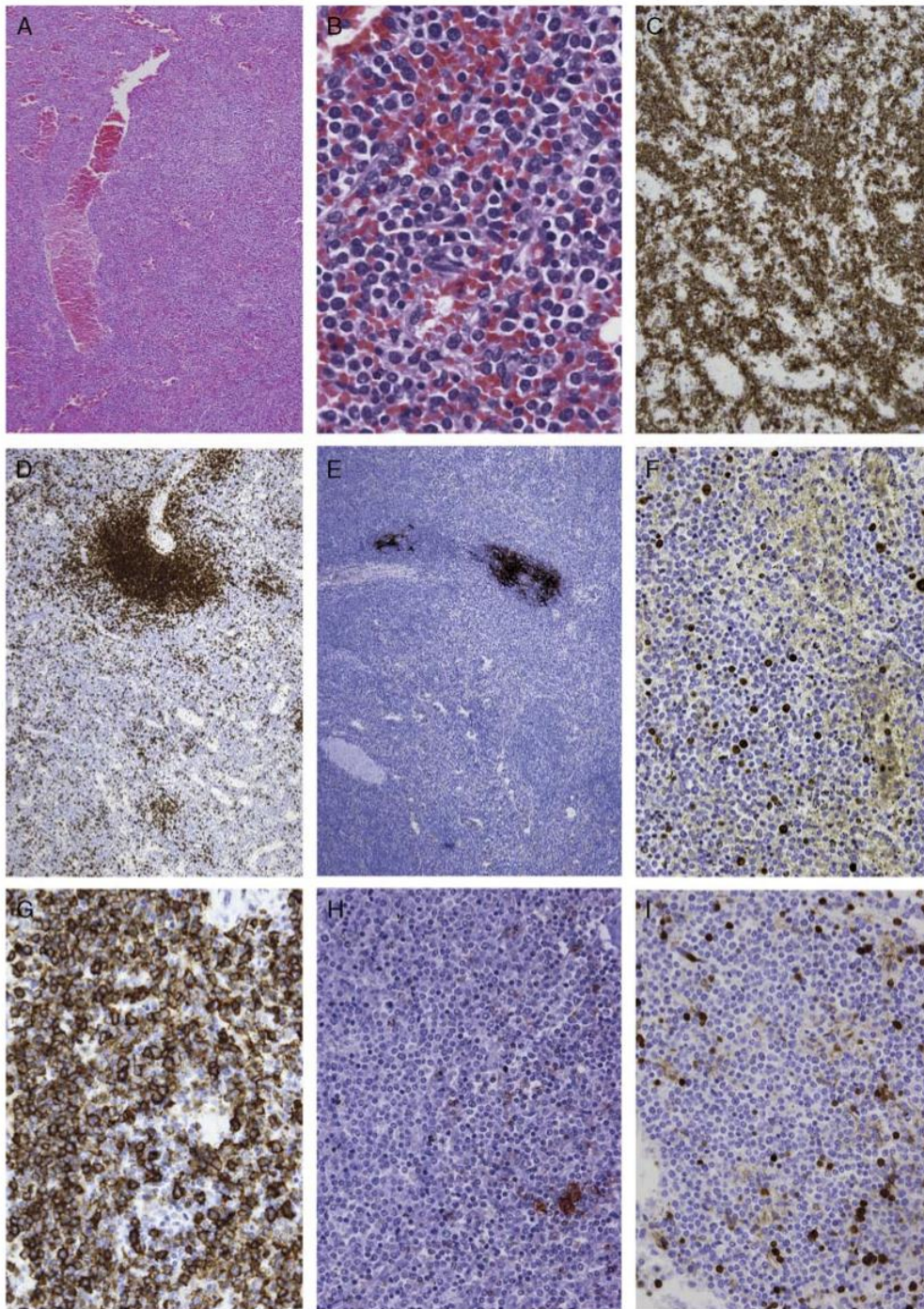


FIGURE 1. Pathologic findings in SDRPL. A, Splenic lesion of case 13 shows a diffuse lymphoid infiltration of the red pulp. Prominent blood cell lakes are seen in this case (hematoxylin and eosin [H&E]). B, The infiltrate is composed by a monotonous population of small lymphocytes, with round nucleus, compact chromatin and inconspicuous nucleoli (H&E). C, Immunohistochemistry shows that the atypical population corresponds to B cells, positive for CD20. Staining for (D) CD3 and (E) CD21 highlights relatively preserved white pulp nodules, with residual T cells and follicles, and a moderate infiltrate of T lymphocytes accompanying the neoplastic B cells. F, Ki-67 shows a low proliferative index. The neoplastic cells are positive for (G) DBA44, and negative for (H) CD25 and (I) annexin A1.

(30 mo follow-up), and another with a short follow-up had *BRAF* mutation (12 mo).

Four out of the 5 patients (80%) who progressed or did not respond to splenectomy had gene mutations, whereas only 3 out of 10 (30%) who achieved a hematological response had gene mutations. Progression-free survival of the 7 patients with gene mutations was significantly shorter than that of the 8 patients without mutations (median time to progression: 24 mo vs. not reached; $P = 0.011$). The presence of *IGHV* mutations or *VH* family usage did not have a prognostic impact (Supplementary Table S5, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A315>).

DISCUSSION

SDRPL is an infrequent B-cell lymphoma included as a provisional entity in the WHO classification.¹ Owing to the overlapping clinical and laboratory features with other splenomegalic lymphomas the diagnosis requires the integration of clinical, morphologic immunophenotypic, and genetic information. The few previously documented series of SDRPL focused on the morphology, histopathology, and cytogenetics but there is no information on gene mutations in this disease and the knowledge of the genomic alterations is limited.^{2-4,16-18} The scanty information on the biologic features of SDRPL likely reflects the problems in establishing the diagnosis. At present, it is possible that SDRPL is both underdiagnosed or overdiagnosed. Indeed, in our series 2 patients were referred initially as relapsed or refractory HCL and 2 others were considered as SMZL on clinical grounds. On the basis of a series of cases with histologic diagnosis, we document here the genomic alterations and the presence of mutations in 5 genes in these lymphomas. SDRPL, unlike HCL, may carry mutations in different genes previously identified in other splenic lymphoid neoplasms. This scenario is similar to what is observed in other low-grade lymphoproliferative disorders, such as CLL, in which a relatively large number of genes are mutated at low frequency ranging from 5% to 15% of the patients, underlining the heterogeneous mutational landscape of these diseases.¹⁹

From a diagnostic perspective, splenic histology is a key element to differentiate this entity from other splenic lymphomas. The main feature of the SDRPL is the diffuse monophasic pattern of infiltration with atrophy of white pulp, in contrast to the biphasic and nodular pattern of SMZL with white pulp replacement and marginal zone differentiation. Although the spleen histology in SDRPL may resemble HCL, the immunophenotype can usually rule out this diagnosis. SMZL may have a cytology and phenotypic profile similar to SDRPL but the spleen histology is clearly different. The differential diagnosis with lymphoplasmacytic lymphoma may be problematic due to the presence of a monoclonal band or focal plasmacytic differentiation in the tissues as shown in some of our SDRPL cases. The lack of *MYD88* mutations in our patients may help to rule out this diagnosis. Finally, HCL-v may raise diagnostic problems even when spleen

histology is available. The lack of plasmacytic differentiation, the monomorphic cytology in the blood and tissues with lymphoid cells with prominent nucleoli and the high lymphocyte counts in HCL-v are useful to differentiate these 2 diseases.

The genetic changes associated with SDRPL are not well defined. In the seminal report by Traverse-Glehen et al,⁴ deletion of 7q was the most common abnormality (4/10 cases) and trisomy 18 as well as trisomy 3 were detected in 2 and 1 cases, respectively. A caveat of this study was the lack of spleen histology in nearly two thirds of these patients. Our findings based on copy number arrays and cytogenetics do not confirm these data as deletion of 7q was only identified in 1 case and no trisomies of chromosomes 3 or 18 were found. These findings are in agreement with the data documented in splenectomized SDRPL patients.² These observations support the idea that SDRPL is not genetically related to SMZL, in which these alterations are frequently found.²⁰ This is also in contrast to HCL-v where deletion of 7q by copy number arrays has been documented in 3/15 cases.²¹ One case of the present series had a translocation involving the rearrangement of the 14q32 locus with 9p13. This alteration results in the juxtaposition of the *PAX5* gene in chromosome 9 to the enhancer of the *IGH* gene, and it is known to lead to *PAX5* overexpression.²² This translocation has been described in a variety of lymphomas, particularly diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and SMZL (4 of 330 cases) but, interestingly, 2 out of the 3 latter cases with spleen histology available had a diffuse pattern of infiltration.²⁰ In a series of 10 patients with different low-grade lymphomas with this rearrangement present, 8 of them transformed to high-grade DLBCL.²³ In our case, the translocation was associated with a complex karyotype and *NOTCH1* mutation and the patient had a progressive disease. Another case harbored unbalanced breakpoint in *TCL1* and *IGH*, in line with the array-based profile. Rearrangements of *TCL1* with the *TCRδ* gene have been described in T-cell prolymphocytic leukemia.²⁴ The gene may be deregulated with high protein expression in some B-cell lymphomas, such as CLL or mantle cell lymphoma (MCL).²⁵ In this series *TCL1* expression was positive in half of cases tested, included the one with *TCL1* breaks. However, the significance of the rearrangement in this case is uncertain.

Our findings show a preferential *IGHV4-34* and *IGHV1-2* gene usage in SDRPL confirming previously reported data.^{2,4} However, this cannot be used to support a diagnosis of SDRPL as *IGHV4-34* family is also overrepresented in HCL-v, SMZL, MCL, and CLL.^{11,26-29}

For the first time we report in SDRPL the presence and prognostic impact of mutations in several genes previously observed in splenic and other small cell lymphoid neoplasms. *NOTCH1* mutations affecting the PEST domain were found in 10% of the cases, and in contrast to SMZL, *NOTCH2* mutations were not found. Mature B-cell lymphomas with *NOTCH1* or *NOTCH2* mutations have been reported to have a more aggressive clinical behavior.^{19,30-32} *NOTCH1* mutations have been

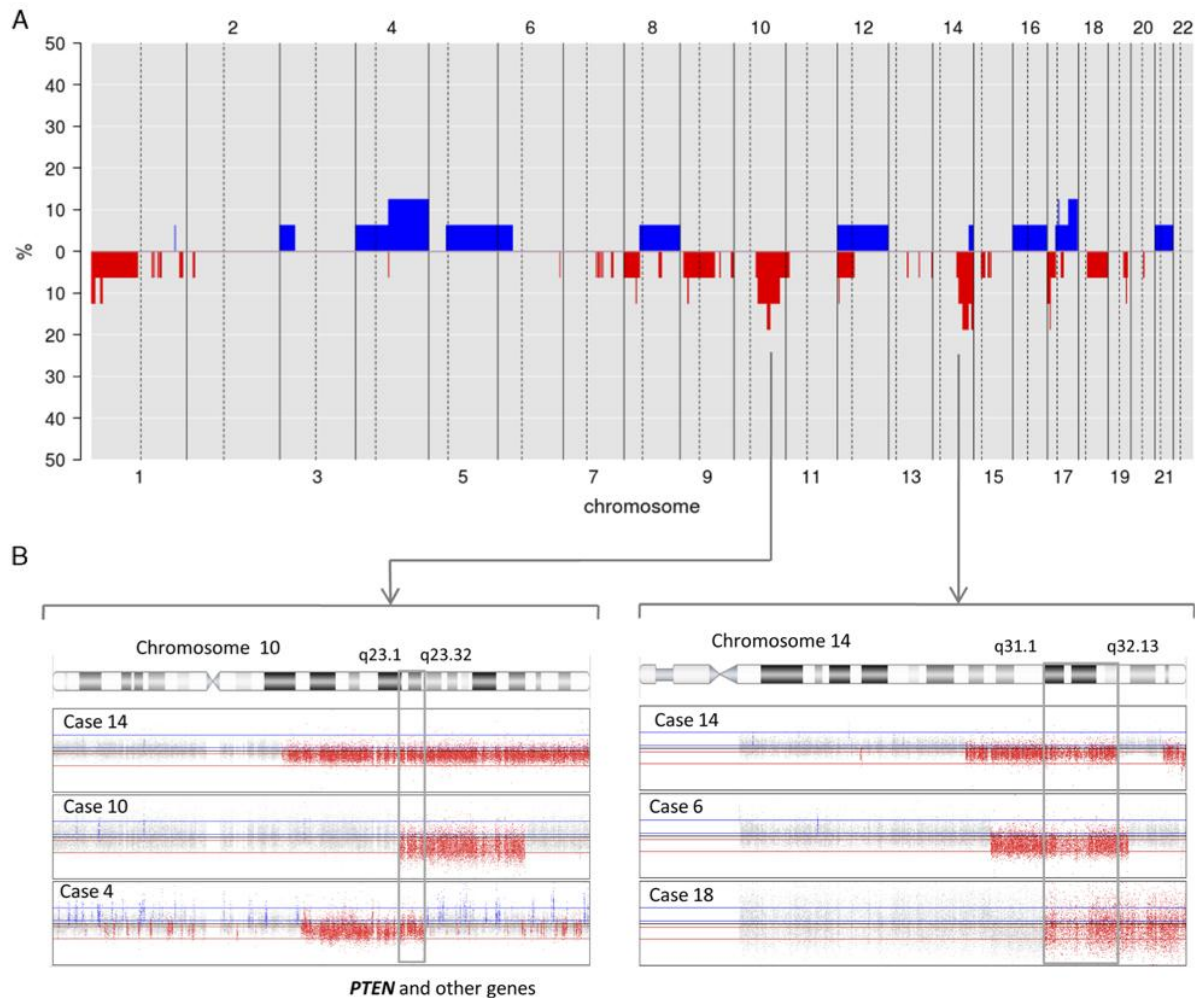


FIGURE 2. A, Genomic profile detected by copy number arrays in 16 SDRPL cases. On the x-axis, the chromosomes are represented horizontally from 1 to 22 and on the y-axis, the percentage of cases showing copy number alterations. Gains are represented in the positive y-axis and colored in blue, whereas losses are represented in the negative y-axis in red. B, Detailed recurrent losses in 10q23 (including *PTEN* gene among others) and in 14q31-q32 are shown.

associated in CLL with frequent transformation to DLBCL,³³ in MCL with blastoid morphology³⁰ and in FL with splenic involvement and frequent association with DLBCL.³⁴ In contrast, the prognostic significance of *NOTCH2* mutations in SMZL is still controversial.^{6,8} In agreement with the findings in CLL, MCL, and FL, the presence of *NOTCH1* mutation in our 2 patients was associated with aggressive disease. Of interest, in 1 of these 2 patients, the mutation was found only in PB lymphoma cells and not in the spleen. This might indicate that the mutation did not occur as a primary event but later in the pathogenesis of the disease similarly to what has been occasionally reported in CLL³⁵ and MCL³⁰ and suggested that may occur in T-cell acute lymphoblastic leukemia.³⁶

Mutations in *MAP2K1* and *BRAF* genes were found in 2 and 1 case, respectively. *MAP2K1* encodes the

dual-specificity kinase MEK1, which is a direct effector of *BRAF* and is directly upstream of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 in the MAPK pathway. Both mutations have been reported to be mutually exclusive.^{9,37} *MAP2K1* mutations have been described in a variety of solid tumours but appear to be extremely rare in hematopoietic malignancies having only been reported in Langerhans cell histiocytosis (11/40 cases),³⁸ HCL-v (10/24 cases) and HCL with *IGHV4-34* usage (5/7 cases).⁹ However, in these HCL-v and HCL cases the diagnosis of SDRPL could be entertained as there was no detail on cytology and spleen or BM histology. The diagnosis of HCL-v in our 2 patients was ruled out by the cytologic features (ie, absence of nucleolus) and low lymphocyte counts. One of our 2 cases with *MAP2K1* mutation had unmutated *IGHV4-34* rearrangement and progressive disease. Other mutations in the *MAPK* family genes have

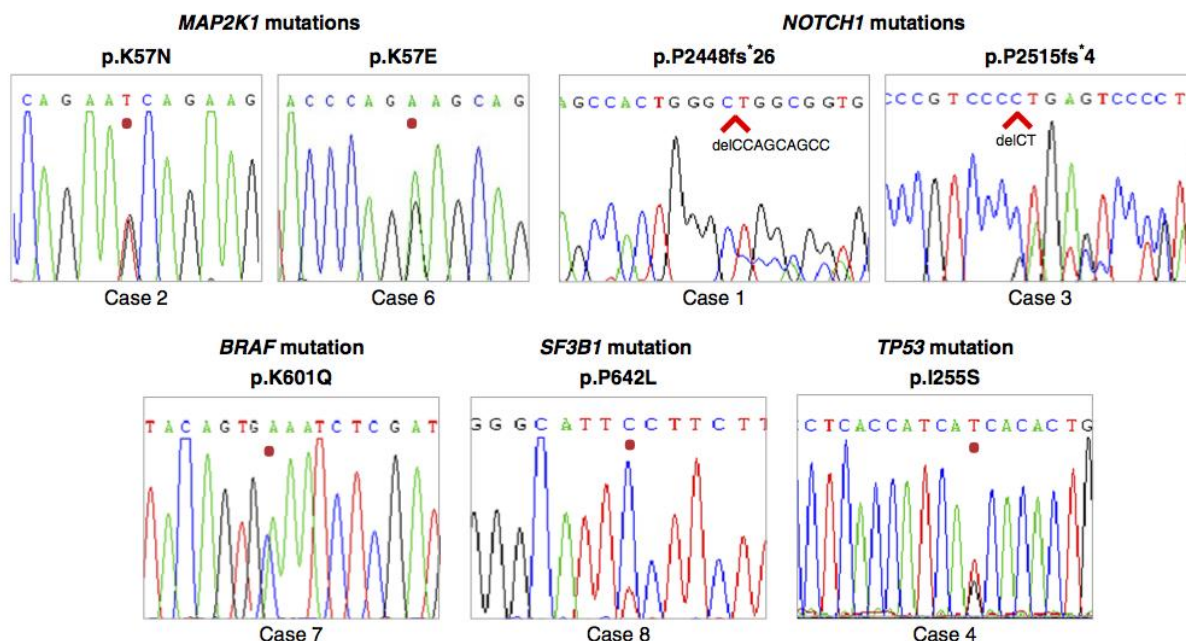


FIGURE 3. Electropherograms of the mutated genes found in SDRPL cases. Two nonsynonymous mutations in *MAP2K1* were found in 2 cases, 2 frameshift mutations in *NOTCH1* were found in other 2 different cases, and *BRAF*, *SF3B1*, and *TP53* nonsynonymous mutations were detected in single cases. The red mark indicates the exact location of the mutation.

been rarely identified in SMZL (*MAP3K3* and *MAP3K14*)^{7,8} and one indolent MCL (*MAP3K14*).³⁰ Our third case with disruption of the above-mentioned pathway had a *BRAF* p.K601Q mutation and thus involving an amino acid next to the V600E that is mutated in HCL. Although a diagnosis of HCL could be considered, this was ruled out by the immunophenotypic profile. An occasional case report of SDRPL with *BRAF* V600E mutation has been documented.¹² *BRAF* mutations are a recurrent feature and molecular hallmark of HCL.⁵ In one series, however, 20% to 25% HCL, particularly those with *IGHV4-34* usage were reported to lack mutations in this gene.^{10,11} Whether all the *BRAF* unmutated cases are a particular genetic subgroup of typical HCL or if a proportion may represent SDRPL is, at present, uncertain.

Mutations in *TP53* appear to be rare in SDRPL and SMZL. Only 1 case in our series had a mutated *TP53* concomitantly to a 17p deletion in the other allele and was the only one with p53 overexpression by immunohistochemistry. The low frequency of mutations of this gene in SDRPL is in contrast with HCL-v where *TP53* mutations have been documented in up to 30% (9/30) of the cases.³⁹

SDRPL patients pursue a chronic clinical course with median survival similar to those seen in SMZL and significantly superior to HCL-v.^{2,4,39} Although there is no standard treatment for these patients, splenectomy allows debulking disease and may control it for years. However, in our series, around 25% of patients had

a more progressive course and a worse outcome and this appears to be underlined by gene mutations also present in other low grade B-cell malignancies. Screening for these mutations in SDRPL, particularly in young patients might help to foresee an unfavorable outcome.

In conclusion, this large cohort of SDRPL shows that these tumors carry mutations in genes previously identified in other splenic and small B-cell lymphoid neoplasms. However, recurrent chromosomal alterations frequent in SMZL such as deletion of 7q and trisomies 3 or 18 are not common findings suggesting that these tumors may correspond to a different entity. Despite the general indolent clinical evolution of SDRPL, some cases may have a progressive or resistant disease to conventional therapies such as therapeutic splenectomy and this aggressive behavior may be associated with mutations in different genes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank M. Prieto, C. Gómez, and R. Zühlke-Jenisch for technical assistance. The authors are also indebted to the Genomics core facility of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDI-BAPS) for the technical help and to the HCB-IDIBAPS Biobank Tumor Bank and Hematopathology Collection for samples procurement. The authors also owe an enormous amount of gratitude to all of the consultant hematologists and pathologists who provided patient samples for this study.

REFERENCES

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2008.
2. Kanellis G, Mollejo M, Montes-Moreno S, et al. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma: revision of a series of cases reveals characteristic clinico-pathological features. *Haematologica*. 2010;95:1122–1129.
3. Mollejo M, Algara P, Mateo MS, et al. Splenic small B-cell lymphoma with predominant red pulp involvement: a diffuse variant of splenic marginal zone lymphoma? *Histopathology*. 2002;40:22–30.
4. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Bauchu EC, et al. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? *Blood*. 2008;111:2253–2260.
5. Tiaacci E, Trifonov V, Schiavoni G, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2011;364:2305–2315.
6. Kiel MJ, Velusamy T, Betz BL, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma. *J Exp Med*. 2012;209:1553–1565.
7. Martinez N, Almaraz C, Vaque JP, et al. Whole-exome sequencing in splenic marginal zone lymphoma reveals mutations in genes involved in marginal zone differentiation. *Leukemia*. 2014;28:1334–1340.
8. Rossi D, Trifonov V, Fangazio M, et al. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *J Exp Med*. 2012;209:1537–1551.
9. Waterfall JJ, Arons E, Walker RL, et al. High prevalence of MAP2K1 mutations in variant and IGHV4-34-expressing hairy-cell leukemias. *Nat Genet*. 2014;46:8–10.
10. Shao H, Calvo KR, Gronborg M, et al. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: development and validation of diagnostic criteria. *Leuk Res*. 2013;37:401–409.
11. Xi L, Arons E, Navarro W, et al. Both variant and IGHV4-34-expressing hairy cell leukemia lack the BRAF V600E mutation. *Blood*. 2012;119:3330–3332.
12. Raess PW, Mintzer D, Husson M, et al. BRAF V600E is also seen in unclassifiable splenic B-cell lymphoma/leukemia, a potential mimic of hairy cell leukemia. *Blood*. 2013;122:3084–3085.
13. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn*. 2006;8:141–151.
14. Salaverria I, Royo C, Carvajal-Cuenca A, et al. CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(–) mantle cell lymphoma. *Blood*. 2013;121:1394–1402.
15. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25:579–586.
16. Petit B, Parrens M, Soubeyran I, et al. Among 157 marginal zone lymphomas, DBA.44(CD76) expression is restricted to tumour cells infiltrating the red pulp of the spleen with a diffuse architectural pattern. *Histopathology*. 2009;54:626–631.
17. Saadoun D, Suarez F, Lefrere F, et al. Splenic lymphoma with villous lymphocytes, associated with type II cryoglobulinemia and HCV infection: a new entity? *Blood*. 2005;105:74–76.
18. Shimizu-Kohno K, Kimura Y, Kiyasu J, et al. Malignant lymphoma of the spleen in Japan: a clinicopathological analysis of 115 cases. *Pathol Int*. 2012;62:577–582.
19. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475:101–105.
20. Salido M, Baro C, Oscier D, et al. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-Cell Lymphoma Group. *Blood*. 2010;116:1479–1488.
21. Hockley SL, Morgan GJ, Leone PE, et al. High-resolution genomic profiling in hairy cell leukemia-variant compared with typical hairy cell leukemia. *Leukemia*. 2011;25:1189–1192.
22. Amakawa R, Ohno H, Fukuhara S. t(9;14)(p13;q32) involving the PAX-5 gene: a unique subtype of 14q32 translocation in B cell non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Hematol*. 1999;69:65–69.
23. Poppe B, De PP, Michaux L, et al. PAX5/IGH rearrangement is a recurrent finding in a subset of aggressive B-NHL with complex chromosomal rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;44:218–223.
24. Virgilio L, Narducci MG, Isobe M, et al. Identification of the TCL1 gene involved in T-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:12530–12534.
25. Aggarwal M, Villuendas R, Gomez G, et al. TCL1A expression delineates biological and clinical variability in B-cell lymphoma. *Mod Pathol*. 2009;22:206–215.
26. Arons E, Kreitman RJ. Molecular variant of hairy cell leukemia with poor prognosis. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(suppl 2):99–102.
27. Bikos V, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Over 30% of patients with splenic marginal zone lymphoma express the same immunoglobulin heavy variable gene: ontogenetic implications. *Leukemia*. 2012;26:1638–1646.
28. Hockley SL, Giannouli S, Morilla A, et al. Insight into the molecular pathogenesis of hairy cell leukaemia, hairy cell leukaemia variant and splenic marginal zone lymphoma, provided by the analysis of their IGH rearrangements and somatic hypermutation patterns. *Br J Haematol*. 2010;148:666–669.
29. Navarro A, Clot G, Royo C, et al. Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. *Cancer Res*. 2012;72:5307–5316.
30. Bea S, Valdes-Mas R, Navarro A, et al. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:18250–18255.
31. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*. 2011;208:1389–1401.
32. Kridel R, Meissner B, Rogic S, et al. Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2012;119:1963–1971.
33. Villamor N, Conde L, Martinez-Trillos A, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia*. 2013;27:1100–1106.
34. Karube K, Martinez D, Royo C, et al. Recurrent mutations of NOTCH genes in follicular lymphoma identify a distinctive subset of tumours. *J Pathol*. 2014;234:423–430.
35. Ouillette P, Saiya-Cork K, Seymour E, et al. Clonal evolution, genomic drivers, and effects of therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2013;19:2893–2904.
36. Mansour MR, Duke V, Foroni L, et al. Notch-1 mutations are secondary events in some patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2007;13:6964–6969.
37. Chakraborty R, Hampton OA, Shen X, et al. Mutually exclusive recurrent somatic mutations in MAP2K1 and BRAF support a central role for ERK activation in LCH pathogenesis. *Blood*. 2014;124:3007–3015.
38. Brown NA, Furtado LV, Betz BL, et al. High prevalence of somatic MAP2K1 mutations in BRAF V600E-negative Langerhans cell histiocytosis. *Blood*. 2014;124:1655–1658.
39. Hockley SL, Else M, Morilla A, et al. The prognostic impact of clinical and molecular features in hairy cell leukaemia variant and splenic marginal zone lymphoma. *Br J Haematol*. 2012;158:347–354.

DISCUSIÓN

Los trabajos que integran esta tesis están centrados en la progresión y transformación histológica de un grupo de linfomas B de bajo grado, y ofrecen una visión global sobre algunos de los mecanismos citogenéticos y moleculares implicados en estos fenómenos. La progresión y transformación de los linfomas indolentes ha sido un tema de estudio recurrente a lo largo de la historia de la hematopatología, utilizando los medios disponibles en cada momento. La microscopia electrónica primero, la histoquímica y la inmunología después, y finalmente la biología molecular han sido hitos tecnológicos alcanzados por la patología que han permitido mejorar el entendimiento de las enfermedades neoplásicas, y en especial las patologías hematológicas, debido a la facilidad para la obtención de muestras. En los últimos años, el desarrollo y la posterior simplificación de las tecnologías de secuenciación masiva han permitido identificar mutaciones recurrentes que afectan a genes implicados en vías importantes involucradas en la diferenciación y activación del linfocito B, así como profundizar en el conocimiento de los mecanismos oncogénicos de muchas neoplasias derivadas de la expansión clonal de células linfoides B maduras. Estos avances han facilitado la identificación de biomarcadores que, además de proporcionar conocimientos sobre la patogénesis de las diversas neoplasias, han proporcionado datos relevantes en lo que concierne a predecir el curso clínico y a nuevas opciones terapéuticas o terapias diana que contribuyen a disminuir la toxicidad del fármaco con un incremento de su eficacia.

Los trabajos que se presentan en esta tesis deben situarse en este contexto. El primer trabajo está centrado en la descripción de un tipo de transformación agresiva poco documentado y caracterizado, que es la transformación de un linfoma de bajo grado a un linfoma de células grandes con fenotipo plasmablástico. La transformación agresiva habitual de los pacientes con CLL o FL es a un linfoma difuso de células grandes convencional, un fenómeno plenamente estudiado en estas dos entidades. Sin embargo, la transformación plasmablástica ha sido documentada en unos pocos casos de CLL¹⁵⁵⁻¹⁵⁸ y tan solo en un caso de FL.¹³⁶ Nuestro trabajo identificó tres casos de CLL y tres FL

que evolucionaron hacia una transformación plasmablástica. Este hallazgo parece ser que guarda relación con el linfoma plasmablástico que se manifiesta como tal sin una fase previa de linfoma de bajo grado. Esta última entidad es un linfoma de células grandes con características morfológicas y fenotípicas plasmablásticas y que se asocia a inmunosupresión e infección por VEB. Las células suelen ser de tamaño grande y poseer un núcleo excéntrico, un nucléolo central y prominente y cromatina laxa. El inmunofenotipo es característico con expresión de antígenos de células plasmáticas como CD138, CD38, IRF4, Blimp1 o XBP1, y ausencia de marcadores de células B madura como CD20 y PAX5.²⁰ Desde un punto de vista morfológico e inmunohistoquímico nuestros casos eran muy similares al linfoma plasmablástico que se manifiesta inicialmente como tal pero a diferencia de éste no parecen asociarse a un estado de inmunosupresión y/o infección por el virus de Epstein-Barr. Solamente en un caso de nuestra serie, se observó la infección por el VEB el cual se hallaba presente en el componente agresivo plasmablástico. Un caso similar de LP-t que era VEB positivo ha sido descrito en un paciente con CLL.¹⁵⁵ En ambos casos los pacientes habían recibido quimioterapia, por lo que no puede descartarse que la transformación pudiera estar favorecida por un estado de inmunosupresión en estos dos pacientes. Debido a que en ninguno de estos dos casos fue estudiado el patrón completo de antígenos de latencia y replicación del VEB no se puede asegurar con certeza el papel que juega este virus en la patogénesis y desarrollo de esta transformación.

Entre las alteraciones genéticas más frecuentes en el linfoma plasmablástico se encuentran las translocaciones que afectan al gen *MYC*, generalmente en asociación con la cadena pesada del gen de las inmunoglobulinas, detectado en casi la mitad de los casos.¹⁵⁹ Al igual que en este, la transformación plasmablástica se asoció a reordenamientos de gen *MYC* en dos de los tres pacientes con CLL, mientras que no se identificaron alteraciones en el linfoma folicular. Los reordenamientos de *MYC* también han sido observados en otros estudios con transformación plasmablástica, tanto en CLL como en FL.^{136,138} También se han descrito translocaciones de *MYC* en la transformación de CLL a un linfoma B difuso de células grandes¹³⁷ y en la transformación del FL a

leucemia aguda linfoblástica^{142,160} y en otras neoplasias linfoides sin evidencia de transformación. Estas observaciones sugieren que las aberraciones de *MYC* juegan también un papel importante en la patogénesis de las neoplasias linfoides agresivas con diferenciación B terminal.

Otras de las diferencias que contrastan entre la transformación clásica a un DLBCL y la transformación plasmablástica, tanto en la CLL como en el FL, son las mutaciones de *TP53*. Esta alteración es un fenómeno muy frecuente implicado en la patogenia de la transformación a DLBCL en estos dos tipos de linfomas.^{102,161} Sin embargo, en nuestra serie, no se observó ninguna alteración citogenética en la región cromosómica de *TP53* en el cromosoma 17p.

El segundo y tercer trabajo se centran en el papel de las mutaciones génicas en la progresión y transformación de dos linfomas indolentes, el linfoma folicular y el linfoma esplénico difuso de la pulpa roja. La secuenciación masiva del genoma o exoma de diferentes neoplasias hematológicas ha permitido identificar dos escenarios distintos sobre cómo influyen las mutaciones genéticas en la patogénesis de estas entidades. Por un lado, los estudios de secuenciación llevados a cabo en la CLL han puesto de manifiesto que esta es una enfermedad en la que existen un número relativamente grande de genes mutados recurrentemente con una baja frecuencia y sólo unos pocos genes mutados en una frecuencia ligeramente más elevada, tales como *NOTCH1*, *SF3B1* y *MYD88*.^{6,7,35,152,162} En contraposición, los estudios de secuenciación en la tricoleucemia han identificado una mutación recurrente que se encuentra en virtualmente todos los casos, y que afecta al gen *BRAFV600E*.^{9,93,94} Esto pone de manifiesto que los mecanismos patogenéticos en las neoplasias hematológicas pueden ser muy variados, y que su estudio debe abordarse de manera amplia. El segundo y tercer trabajo aprovechan toda esta información generada en los últimos años y exploran la presencia de mutaciones ya descritas en otras neoplasias hematológicas pero todavía no identificadas en el FL o el SDRPL.

El segundo trabajo está enfocado en la detección de las mutaciones de *NOTCH* en el linfoma folicular y en casos transformados a linfoma difuso de

células grandes. *NOTCH1* es un gen que se encuentra implicado en otras neoplasias hematológicas, como la leucemia linfoblástica T y algunos linfomas B maduros, asociándose además, a un comportamiento clínico agresivo.^{6,7,11,163} En esta serie de 137 muestras de 112 pacientes con FL identificamos siete casos (6%) con mutaciones de *NOTCH*, cinco de ellos en *NOTCH1* y dos en *NOTCH2*. Estos FL tenían unas características clínico-patológicas peculiares, ya que tenían un predominio en mujeres, afectación esplénica frecuente, no solían tener la t(14;18) y se asociaban de manera significativa a transformación a linfoma B de células grandes. La frecuencia de mutaciones en *NOTCH* en el FL es similar a la observada en CLL y algo inferior a la del linfoma de células del manto. Las mutaciones de *NOTCH1* se han asociado a una mayor transformación a DLBCL, peor pronóstico en CLL y a formas blastoides en MCL. En este estudio, cuatro FL con *NOTCH* mutado mostraron un componente simultáneo de DLBCL, y otro caso de FL manifestó una transformación histológica franca a DLBCL en la recaída. Estos hallazgos sugieren que las mutaciones de *NOTCH* en el FL, al igual que en CLL o en MCL, también están asociadas con la agresividad del linfoma, cuando se compara con la frecuencia de transformación histológica previamente descrita (25-35%). En 14 pacientes se pudo analizar la presencia de mutaciones en muestras secuenciales. Esto incluía 3 casos *NOTCH*-mutado y 9 casos transformados *NOTCH*-no mutado. En todos los casos el estatus mutacional no cambió entre las muestras secuenciales, con independencia de la transformación histológica. Estos hallazgos sugieren que la mutación de *NOTCH1* podría ser uno de los eventos iniciales y facilitar la progresión del FL a DLBCL. Estos hallazgos también han sido documentados en los estudios de muestras secuenciales en la CLL.^{6,154}

En esta serie, la frecuencia de la t(14;18) en los casos *NOTCH*-mutados (14%) es más baja que en el FL convencional, que se sitúa alrededor del 80%. Varios estudios han demostrado que los FL sin la t(14;18) tienen un mayor grado histológico, una menor frecuencia de expresión de CD10 y BCL2, y un perfil genómico distinto, siendo más comunes los reordenamientos de BCL6, trisomía 3 y trisomía 18.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ También se ha identificado un forma de FL sin la t(14;18), con patrón de crecimiento predominantemente difuso, que presenta

frecuentemente la delección de 1p36.⁷⁴ Los hallazgos de nuestro estudio sugieren que, además de las alteraciones genéticas previamente descritas, las mutaciones de *NOTCH* pueden contribuir a la linfomagénesis y agresividad de un subtipo de FL negativos para la t(14;18).

La afectación esplénica es un fenómeno inusual en FL. En este estudio los FL con mutación de *NOTCH* tenían mayor frecuencia de afectación esplénica que los *NOTCH wild-type*. La activación de *NOTCH2* es esencial para que las células B normales se diferencien en células de la zona marginal.¹⁶⁷ La activación de *NOTCH* también promueve a las células B para que se localicen en la zona marginal, mientras que su inhibición induce la relocalización de las células de la zona marginal a otros órganos, como la sangre periférica, resultando en una atenuación de la zona marginal.^{168,169} La frecuencia de las mutaciones en *NOTCH2*, con su activación subsecuente en el SMZL, superior a la que se observa en el FL y CLL, podría ser uno de los determinantes de promover la acumulación de células del linfoma en el bazo. Por el contrario, aunque *NOTCH1* se halla involucrado en la diferenciación de linfocitos B a células secretoras de anticuerpo, se desconoce su asociación con la diferenciación de linfocitos B en el bazo

Alteraciones del oncogén *MYC* y/o del gen supresor de tumores *TP53* se encuentran involucradas en una proporción de casos de transformación de FL. En este estudio también se analizó la presencia de translocaciones de *MYC* y mutaciones en *TP53* para explorar la relación entre estos mecanismos y las mutaciones de *NOTCH*, con la transformación histológica agresiva del FL. En nuestra serie, se identificaron positividad para la proteína p53 o reordenamiento del gen *MYC* en el componente de DLBCL en el 50% de los casos sin la mutación de *NOTCH1*. Sin embargo, no se observaron estas alteraciones en ninguno de los casos con la mutación de *NOTCH1*. Esto indica que las mutaciones de *NOTCH* pueden ser un mecanismo de transformación agresiva alternativo al de la desregulación de *TP53* y *MYC*.

La relación entre las mutaciones de *NOTCH2* y SMZL plantean la cuestión de si los FL *NOTCH*-mutados observados en el estudio podrían estar relacionados

con esos tumores. Los cinco FL con mutación de *NOTCH* y afectación esplénica tenían un claro patrón de crecimiento folicular, con una trama de células foliculares dendríticas conservada y carecían de diferenciación monocitoide. Además, los cinco casos expresaban marcadores de centro germinal como CD10, BCL6 o LMO2, y dos de ellos presentaban la t(14;18), lo que apoyaba el diagnóstico de FL en estos casos.

La identificación de mutaciones de *NOTCH1* puede abrir nuevas posibilidades terapéuticas en el tratamiento del FL. Las γ -secretasas activan la vía *NOTCH* rompiendo el dominio transmembrana, liberando así el dominio intracelular al citoplasma. Los inhibidores de las γ -secretasas se han propuesto como una posible terapia en los tumores con la mutación de *NOTCH*, y podrían ser efectivos en los FL o cualquier otro tumor que tenga estas mutaciones. Aunque todavía se requiere un “refinamiento” en la composición de los inhibidores de γ -secretasas para su utilización en la práctica clínica, recientes estudios indican que la modulación de la dosis o la combinación con otros fármacos como los corticoesteroides, pueden incrementar el efecto anti-tumoral y reducir la toxicidad.^{170,171}

En el tercer trabajo se investigó la presencia de mutaciones genéticas presentes en un linfoma con afectación primariamente esplénica, el linfoma esplénico difuso de la pulpa roja, y se analizó su papel en la progresión de la enfermedad. Las alteraciones moleculares descritas en los linfomas esplénicos nos han dado una visión de su patogénesis y han mostrado ser útiles en el diagnóstico de algunas entidades, particularmente en la tricoleucemia, donde la mutación de *BRAF* se detecta en la gran mayoría de casos y, hasta cierto punto, en el SMZL y la tricoleucemia variante, en los cuales se observan con una elevada frecuencia mutaciones en *NOTCH2* y *KLF2* en el primero, y *MAP2K1* en la tricoleucemia variante. Sin embargo, al igual que acontece con *NOTCH1* en la CLL o *MYD88* en el linfoma linfoplasmacítico, estas mutaciones no están restringidas a una única enfermedad y sólo se observan en una proporción de casos.

Este trabajo es pionero en lo que se refiere a la identificación de genes que se hallan mutados en el SDRPL y por consiguiente implicados en su patogenia. En

esta serie de 19 pacientes, se identificó la presencia de cinco genes mutados en siete pacientes. Dos casos tenían mutaciones en *MAP2K1*, otros dos en *NOTCH1*, y las mutaciones de *TP53*, *BRAF* y *SF3B1* se identificaron en un caso cada una. Las dos mutaciones en *NOTCH1* ocurrieron en el dominio PEST, al igual que se ha descrito en otros linfomas B de bajo grado, como CLL, MCL o en nuestro trabajo previamente descrito en FL. De la misma manera, la presencia de la mutación de este gen en los dos pacientes se asoció con un curso de la enfermedad agresivo, ya que los dos pacientes progresaron y necesitaron una segunda línea de tratamiento con quimioterapia. Estos hallazgos confirman el papel que posee la desregulación de *NOTCH1* como elemento importante en la progresión y transformación de los linfomas. En esta serie de linfomas esplénicos no se identificaron mutaciones en *NOTCH2* al contrario que en el linfoma esplénico marginal lo cual sustentaría en parte que se tratan de dos entidades diferentes.

Tres pacientes manifestaron mutaciones en genes de la vía de MAP que afectaban a *MAP2K1* en dos casos y *BRAF* en uno. El gen *MAP2K1* codifica para la kinasa MEK1, que es un efector directo de BRAF y se encuentra en un nivel inmediatamente superior a las kinasas ERK1 y ERK 2 en la vía de MAPK. La mutación de *MAP2K1* se ha descrito en algunos tumores sólidos, pero es muy rara en neoplasias hematológicas, habiéndose descrito sólo en histiocitosis de células de Langerhans, tricoleucemia con el reordenamiento *IGHV4-34* y tricoleucemia variante. Sin embargo, las herramientas diagnósticas en estos casos publicados de tricoleucemia y tricoleucemia variante eran muy limitadas, por lo que no se puede descartar de que se trataran de SDRPL. Los diagnósticos de tricoleucemia o tricoleucemia variante en los dos pacientes con la mutación de *MAP2K1* fueron descartados por las características citológicas (ausencia de nucléolo), los niveles bajos de linfocitosis en sangre periférica y por el inmunofenotipo. Uno de los pacientes mostraba el reordenamiento *IGHV4-34* y presentó un curso clínico progresivo que requirió tratamiento con quimioterapia. El tercer paciente con alteración la vía de MAPK presentó la mutación de *BRAF* K601Q, una alteración que se encuentra adyacente al aminoácido V600E, que es el que se encuentra mutado en tricoleucemia. En este caso se pudo descartar el diagnóstico de tricoleucemia por el perfil

inmunofenotípico. Esta mutación específica no ha sido descrita anteriormente. Sí se ha descrito excepcionalmente la mutación de *BRAF* V600E en SDRPL.¹⁷²

Un caso mostró mutaciones en *TP53*, concomitantemente con una delección de 17p en el otro alelo. Este paciente evolucionó rápida y desfavorablemente sin respuesta a la esplenectomía ni a la quimioterapia. La baja frecuencia de mutaciones de *TP53* en esta serie contrasta con lo que se observa en la tricoleucemia variante, donde se han documentado en hasta un 30% de los casos.¹⁷³

Las alteraciones citogenéticas en SDRPL descritas en trabajos previos incluyen la delección de 7q, y las trisomías 3 y 18.^{85,86} Sin embargo, en el estudio de Traverse-Glehen, a pesar de que incluyen 37 pacientes en su serie, en dos tercios de los pacientes no se disponía de histología del bazo. En nuestro estudio basado en *arrays* de *copy number* y citogenética no hemos confirmado esos datos. La delección de 7q sólo se identificó en un caso mientras que las trisomías 3 y 18 estaban ausentes. Estos resultados sí concuerdan con lo publicado en series de pacientes esplenectomizados.⁸⁶ Estas observaciones junto con la ausencia de mutaciones en *NOTCH2* apoyarían la noción de que el SDRPL no está genéticamente relacionado con el SMZL.

Histológicamente el SDRPL tiene una morfología característica, consistente en un borramiento difuso de la pulpa roja y la pulpa blanca por una proliferación de linfocitos B, con un inmunofenotipo inespecífico. Esta morfología es bastante diferente del patrón que suele adoptar el SMZL, que es el linfoma primario esplénico más frecuente, y que suele consistir en una expansión de la zona marginal de la pulpa blanca, característicamente mostrando un patrón bifásico. Es por ello, que con la pieza de esplenectomía, estos dos linfomas se suelen diferenciar sin problemas. Sin embargo la realización de la esplenectomía no siempre es posible en los pacientes, ya sea porque el curso de la enfermedad es muy indolente y no se quiere someter al paciente a una intervención puramente diagnóstica, o porque el estado general del paciente es frágil y el riesgo de la intervención es elevado. Esta actitud está apoyada por algunos artículos, anteriores a la aparición de la 4 edición del libro de la WHO, que indican que se puede realizar el diagnóstico de SMZL con la combinación de

características obtenidas mediante morfología linfocitaria en sangre periférica, inmunofenotipo, citogenética, histología de médula ósea y, si está disponible, la morfología esplénica.¹⁷⁴ Este razonamiento acepta la posibilidad de establecer el diagnóstico de SMZL sin pieza histológica del bazo. Sin embargo, el SDRPL se puede presentar clínica y biológicamente de manera similar al SMZL, pudiéndose solapar las características morfológicas, inmunofenotípicas y el patrón de infiltración de médula ósea, por lo que para establecer el diagnóstico específico de alguno de estos linfomas es imprescindible conocer la histología esplénica. Algunos estudios que comparan el SMZL y el SDRPL han sustentado su diagnóstico meramente en la combinación de hallazgos en sangre periférica, médula ósea, inmunofenotipo y citogenética.⁸⁵ Esto abre la posibilidad de que en el estudio pudieran haber mezclado entidades diferentes. Esta posibilidad se ve reforzada por el hecho de que las alteraciones citogenéticas encontradas en este trabajo muestran discrepancias con las obtenidas en otros estudios donde sí se analizó la histología esplénica, incluyendo el trabajo de la presente tesis, como se ha comentado anteriormente.⁸⁶ Desde un punto de vista diagnóstico, nuestro trabajo sugiere que las alteraciones citogenéticas y mutaciones de ciertos genes podrían contribuir de forma adicional al diagnóstico diferencial entre el SMZL y el SDRPL en la circunstancia de no disponer de información de la histología del bazo.

Desde el punto de vista clínico, los pacientes con SDRPL tienen un curso crónico con una supervivencia media similar a la del SMZL. Aunque no hay un tratamiento estándar para estos pacientes, la esplenectomía puede ser eficaz permitiendo controlar la enfermedad durante años. Sin embargo en nuestra serie, alrededor de un 25% de los pacientes manifestaron un curso progresivo y mostraron un peor pronóstico, lo que parece estar relacionado con la presencia de mutaciones en diferentes genes que también se encuentran presentes en otras neoplasias B de bajo grado.

Los estudios en FL y en SDRPL han puesto de manifiesto que la presencia de mutaciones en algunos genes hasta ahora poco conocidos como *NOTCH1* o *MAP2K1* tienen una implicación en la progresión o transformación de los linfomas, y ello es similar a lo que se ha publicado previamente en CLL y MCL.

Además, como se ha comentado previamente, la identificación de mutaciones de *NOTCH1* puede permitir nuevos abordajes terapéuticos mediante el uso de los inhibidores de las γ -secretasas.

CONCLUSIONES

- 1.- La transformación plasmablástica es un tipo de evolución agresiva poco frecuente en linfomas de bajo grado, y que manifiesta analogías y diferencias con el linfoma plasmablástico
- 2.- La transformación plasmablástica puede asociarse o no con alteraciones del gen *MYC*, pero a diferencia del linfoma plasmablástico no suele estar asociada a inmunodeficiencia o infección por EBV.
- 3.- Las mutaciones de *NOTCH1* y 2 son poco frecuentes en el linfoma folicular (6.3%).
- 4.- Los linfomas foliculares con mutaciones de *NOTCH1* y 2 suelen presentarse con afectación esplénica, tienen una menor frecuencia de t(14;18) y se asocian frecuentemente a transformación a linfoma de células grandes.
- 5.- El diagnóstico de linfoma esplénico difuso de la pulpa roja debe realizarse en la pieza de esplenectomía, ya que las características clínico-biológicas pueden solaparse con las de otros linfomas que cursan con esplenomegalia.
- 6.- El linfoma esplénico difuso de la pulpa roja presenta alteraciones moleculares y citogenéticas diferentes al SMZL.
- 7.- El linfoma esplénico difuso de la pulpa roja presenta mutaciones somáticas en genes asociados a linfomagénesis en otros linfomas, como *NOTCH1*, *TP53*, *MAP2K1*, *BRAF* y *SF3B1*, y no parecen tener ninguna mutación característica.
- 8.- Las mutaciones de *NOTCH1*, *TP53* y *MAP2K1* se asocian a un curso de la enfermedad más progresivo en el linfoma esplénico difuso de la pulpa roja.

BIBLIOGRAFÍA

1. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(1):22-33.
2. Carbone A, Gloghini A, Cabras A, Elia G. The Germinal centre-derived lymphomas seen through their cellular microenvironment. *Br J Haematol*. 2009;145(4):468-480.
3. Tandon B, Swerdlow SH, Hasserjian RP, Surti U, Gibson SE. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: another neoplasm related to the B-cell follicle? *Leuk Lymphoma*. 2015;56(12):3378-3386.
4. Basso K, Dalla-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(3):172-184.
5. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(10):3879-3884.
6. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*. 2011;208(7):1389-1401.
7. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475(7354):101-105.
8. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*. 2011;43(9):830-837.
9. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med*. 2011;364(24):2305-2315.
10. Kiel MJ, Velusamy T, Betz BL, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma. *J Exp Med*. 2012;209(9):1553-1565.
11. Kridel R, Meissner B, Rogic S, et al. Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2012;119(9):1963-1971.
12. Love C, Sun Z, Jima D, et al. The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. *Nat Genet*. 2012;44(12):1321-1325.
13. Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2012;367(9):826-833.
14. Rossi D, Ciardullo C, Gaidano G. Genetic aberrations of signaling pathways in lymphomagenesis: revelations from next generation sequencing studies. *Semin Cancer Biol*. 2013;23(6):422-430.
15. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-5456.
16. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*. 2015;90(5):446-460.
17. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1840-1847.

18. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1848-1854.
19. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348(18):1764-1775.
20. Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
21. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*. 2007;109(1):259-270.
22. Chu CC, Catterall R, Hatzi K, et al. Chronic lymphocytic leukemia antibodies with a common stereotypic rearrangement recognize nonmuscle myosin heavy chain IIA. *Blood*. 2008;112(13):5122-5129.
23. ten Hacken E, Burger JA. Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia--focus on the B-cell receptor. *Clin Cancer Res*. 2014;20(3):548-556.
24. Soma LA, Craig FE, Swerdlow SH. The proliferation center microenvironment and prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Hum Pathol*. 2006;37(2):152-159.
25. Onaindia A, Gómez S, Piris-Villaespesa M, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells in lymph nodes show frequent NOTCH1 activation. *Haematologica*. 2015;100(5):e200-203.
26. Giné E, Martínez A, Villamor N, et al. Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia ("accelerated" chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica*. 2010;95(9):1526-1533.
27. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med*. 1990;323(11):720-724.
28. Zenz T, Mertens D, Döhner H, Stilgenbauer S. Importance of genetics in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev*. 2011;25(3):131-137.
29. Quesada V, Ramsay AJ, Rodríguez D, Puente XS, Campo E, López-Otín C. The genomic landscape of chronic lymphocytic leukemia: clinical implications. *BMC Med*. 2013;11:124.
30. Gruber M, Wu CJ. Evolving understanding of the CLL genome. *Semin Hematol*. 2014;51(3):177-187.
31. Martín-Subero JL, López-Otín C, Campo E. Genetic and epigenetic basis of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2013;20(4):362-368.
32. Landau DA, Wu CJ. Chronic lymphocytic leukemia: molecular heterogeneity revealed by high-throughput genomics. *Genome Med*. 2013;5(5):47.
33. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*. 2014;123(21):3247-3254.
34. Rossi D, Bruscaggin A, Spina V, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*. 2011;118(26):6904-6908.

35. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(26):2497-2506.
36. Martínez-Trillos A, Pinyol M, Navarro A, et al. Mutations in TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood*. 2014;123(24):3790-3796.
37. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1910-1916.
38. Beà S, López-Guillermo A, Ribas M, et al. Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). *Am J Pathol*. 2002;161(3):957-968.
39. Shanafelt TD, Jelinek D, Tschumper R, et al. Cytogenetic abnormalities can change during the course of the disease process in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2006;24(19):3218-3219; author reply 3219-3220.
40. Stilgenbauer S, Sander S, Bullinger L, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: acquisition of high-risk genomic aberrations associated with unmutated VH, resistance to therapy, and short survival. *Haematologica*. 2007;92(9):1242-1245.
41. Rossi D, Khiabanian H, Spina V, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(14):2139-2147.
42. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015;526(7574):525-530.
43. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002;3(6):415-428.
44. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*. 2003;300(5618):455.
45. Ziller MJ, Gu H, Müller F, et al. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature*. 2013;500(7463):477-481.
46. Kulis M, Heath S, Bibikova M, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2012;44(11):1236-1242.
47. Herold M, Haas A, Srock S, et al. Rituximab added to first-line mitoxantrone, chlorambucil, and prednisolone chemotherapy followed by interferon maintenance prolongs survival in patients with advanced follicular lymphoma: an East German Study Group Hematology and Oncology Study. *J Clin Oncol*. 2007;25(15):1986-1992.
48. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 2005;106(12):3725-3732.
49. Schmatz AI, Streubel B, Kretschmer-Chott E, et al. Primary follicular lymphoma of the duodenum is a distinct mucosal/submucosal variant of follicular lymphoma: a retrospective study of 63 cases. *J Clin Oncol*. 2011;29(11):1445-1451.

50. Relander T, Johnson NA, Farinha P, Connors JM, Sehn LH, Gascoyne RD. Prognostic factors in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2010;28(17):2902-2913.
51. Dave SS, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*. 2004;351(21):2159-2169.
52. Glas AM, Kersten MJ, Delahaye LJ, et al. Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. *Blood*. 2005;105(1):301-307.
53. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, et al. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*. 2006;108(9):2957-2964.
54. Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood*. 2004;104(5):1258-1265.
55. Buske C, Hoster E, Dreyling M, Hasford J, Unterhalt M, Hiddemann W. The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) separates high-risk from intermediate- or low-risk patients with advanced-stage follicular lymphoma treated front-line with rituximab and the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) with respect to treatment outcome. *Blood*. 2006;108(5):1504-1508.
56. Wahlin BE, Yri OE, Kimby E, et al. Clinical significance of the WHO grades of follicular lymphoma in a population-based cohort of 505 patients with long follow-up times. *Br J Haematol*. 2012;156(2):225-233.
57. Anderson JR, Vose JM, Bierman PJ, et al. Clinical features and prognosis of follicular large-cell lymphoma: a report from the Nebraska Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol*. 1993;11(2):218-224.
58. Hans CP, Weisenburger DD, Vose JM, et al. A significant diffuse component predicts for inferior survival in grade 3 follicular lymphoma, but cytologic subtypes do not predict survival. *Blood*. 2003;101(6):2363-2367.
59. Rodriguez J, McLaughlin P, Hagemeister FB, et al. Follicular large cell lymphoma: an aggressive lymphoma that often presents with favorable prognostic features. *Blood*. 1999;93(7):2202-2207.
60. Chau I, Jones R, Cunningham D, et al. Outcome of follicular lymphoma grade 3: is anthracycline necessary as front-line therapy? *Br J Cancer*. 2003;89(1):36-42.
61. Shustik J, Quinn M, Connors JM, Gascoyne RD, Skinnider B, Sehn LH. Follicular non-Hodgkin lymphoma grades 3A and 3B have a similar outcome and appear incurable with anthracycline-based therapy. *Ann Oncol*. 2011;22(5):1164-1169.
62. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Roncador G, et al. High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(9):1470-1476.
63. Alvaro T, Lejeune M, Salvadó MT, et al. Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol*. 2006;24(34):5350-5357.
64. Canioni D, Salles G, Mounier N, et al. High numbers of tumor-associated macrophages have an adverse prognostic value that can be circumvented by rituximab in patients with follicular lymphoma enrolled onto the GELA-GOELAMS FL-2000 trial. *J Clin Oncol*. 2008;26(3):440-446.

65. Glas AM, Knoop L, Delahaye L, et al. Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25(4):390-398.
66. Wahlin BE, Sander B, Christensson B, Kimby E. CD8+ T-cell content in diagnostic lymph nodes measured by flow cytometry is a predictor of survival in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13(2 Pt 1):388-397.
67. Zelenetz AD, Gordon LI, Wierda WG, et al. Non-Hodgkin's lymphomas, version 2.2014. *J Natl Compr Canc Netw*. 2014;12(6):916-946.
68. Eray M, Postila V, Eeva J, et al. Follicular lymphoma cell lines, an in vitro model for antigenic selection and cytokine-mediated growth regulation of germinal centre B cells. *Scand J Immunol*. 2003;57(6):545-555.
69. Younes SF, Beck AH, Lossos IS, Levy R, Warnke RA, Natkunam Y. Immunoarchitectural patterns in follicular lymphoma: efficacy of HGAL and LMO2 in the detection of the interfollicular and diffuse components. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(9):1266-1276.
70. Tilly H, Rossi A, Stamatoullas A, et al. Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma. *Blood*. 1994;84(4):1043-1049.
71. Horsman DE, Connors JM, Pantzar T, Gascoyne RD. Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14;18). *Genes Chromosomes Cancer*. 2001;30(4):375-382.
72. Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia*. 2007;21(1):18-29.
73. Cheung KJ, Delaney A, Ben-Neriah S, et al. High resolution analysis of follicular lymphoma genomes reveals somatic recurrent sites of copy-neutral loss of heterozygosity and copy number alterations that target single genes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;49(8):669-681.
74. Katzenberger T, Kalla J, Leich E, et al. A distinctive subtype of t(14;18)-negative nodal follicular non-Hodgkin lymphoma characterized by a predominantly diffuse growth pattern and deletions in the chromosomal region 1p36. *Blood*. 2009;113(5):1053-1061.
75. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, et al. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*. 1989;57(1):79-88.
76. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature*. 1991;349(6306):254-256.
77. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*. 2011;476(7360):298-303.
78. Ryan RJ, Nitta M, Borger D, et al. EZH2 codon 641 mutations are common in BCL2-rearranged germinal center B cell lymphomas. *PLoS One*. 2011;6(12):e28585.
79. Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature*. 2011;471(7337):189-195.
80. Green MR, Gentles AJ, Nair RV, et al. Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma. *Blood*. 2013;121(9):1604-1611.

81. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet.* 2010;42(2):181-185.
82. Yildiz M, Li H, Bernard D, et al. Activating STAT6 mutations in follicular lymphoma. *Blood.* 2015;125(4):668-679.
83. Okosun J, Bödör C, Wang J, et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat Genet.* 2014;46(2):176-181.
84. Mollejo M, Algara P, Mateo MS, et al. Splenic small B-cell lymphoma with predominant red pulp involvement: a diffuse variant of splenic marginal zone lymphoma? *Histopathology.* 2002;40(1):22-30.
85. Traverse-Glehen A, Baseggio L, Bauchu EC, et al. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? *Blood.* 2008;111(4):2253-2260.
86. Kanellis G, Mollejo M, Montes-Moreno S, et al. Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma: revision of a series of cases reveals characteristic clinico-pathological features. *Haematologica.* 2010;95(7):1122-1129.
87. Salido M, Baró C, Oscier D, et al. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-Cell Lymphoma Group. *Blood.* 2010;116(9):1479-1488.
88. Clipson A, Wang M, de Leval L, et al. KLF2 mutation is the most frequent somatic change in splenic marginal zone lymphoma and identifies a subset with distinct genotype. *Leukemia.* 2015;29(5):1177-1185.
89. Rossi D, Trifonov V, Fangazio M, et al. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *J Exp Med.* 2012;209(9):1537-1551.
90. Parry M, Rose-Zerilli MJ, Gibson J, et al. Whole exome sequencing identifies novel recurrently mutated genes in patients with splenic marginal zone lymphoma. *PLoS One.* 2013;8(12):e83244.
91. Martínez N, Almaraz C, Vaqué JP, et al. Whole-exome sequencing in splenic marginal zone lymphoma reveals mutations in genes involved in marginal zone differentiation. *Leukemia.* 2014;28(6):1334-1340.
92. Parry M, Rose-Zerilli MJ, Ljungström V, et al. Genetics and Prognostication in Splenic Marginal Zone Lymphoma: Revelations from Deep Sequencing. *Clin Cancer Res.* 2015;21(18):4174-4183.
93. Arcaini L, Zibellini S, Boveri E, et al. The BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia and other mature B-cell neoplasms. *Blood.* 2012;119(1):188-191.
94. Blombery PA, Wong SQ, Hewitt CA, et al. Detection of BRAF mutations in patients with hairy cell leukemia and related lymphoproliferative disorders. *Haematologica.* 2012;97(5):780-783.
95. Andrulis M, Penzel R, Weichert W, von Deimling A, Capper D. Application of a BRAF V600E mutation-specific antibody for the diagnosis of hairy cell leukemia. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(12):1796-1800.
96. Xi L, Arons E, Navarro W, et al. Both variant and IGHV4-34-expressing hairy cell leukemia lack the BRAF V600E mutation. *Blood.* 2012;119(14):3330-3332.
97. Waterfall JJ, Arons E, Walker RL, et al. High prevalence of MAP2K1 mutations in variant and IGHV4-34-expressing hairy-cell leukemias. *Nat Genet.* 2014;46(1):8-10.

98. Richter MN. Generalized Reticular Cell Sarcoma of Lymph Nodes Associated with Lymphatic Leukemia. *Am J Pathol.* 1928;4(4):285-292.287.
99. LORTHOLARY P, BOIRON M, RIPAULT P, LEVY JP, MANUS A, BERNARD J. [CHRONIC LYMPHOID LEUKEMIA SECONDARILY ASSOCIATED WITH A MALIGNANT RETICULOPATHY: RICHTER'S SYNDROME]. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1964;4:621-644.
100. Tsimberidou AM, Keating MJ. Richter syndrome: biology, incidence, and therapeutic strategies. *Cancer.* 2005;103(2):216-228.
101. Mao Z, Quintanilla-Martinez L, Raffeld M, et al. IgVH mutational status and clonality analysis of Richter's transformation: diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma in association with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) represent 2 different pathways of disease evolution. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(10):1605-1614.
102. Rossi D, Spina V, Deambrogi C, et al. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood.* 2011;117(12):3391-3401.
103. Rossi D, Gaidano G. Richter syndrome: molecular insights and clinical perspectives. *Hematol Oncol.* 2009;27(1):1-10.
104. Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, et al. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(12):5413-5417.
105. Matolcsy A, Inghirami G, Knowles DM. Molecular genetic demonstration of the diverse evolution of Richter's syndrome (chronic lymphocytic leukemia and subsequent large cell lymphoma). *Blood.* 1994;83(5):1363-1372.
106. Rossi D, Spina V, Cerri M, et al. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res.* 2009;15(13):4415-4422.
107. Scandurra M, Rossi D, Deambrogi C, et al. Genomic profiling of Richter's syndrome: recurrent lesions and differences with de novo diffuse large B-cell lymphomas. *Hematol Oncol.* 2010;28(2):62-67.
108. Chigrinova E, Rinaldi A, Kwee I, et al. Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome. *Blood.* 2013;122(15):2673-2682.
109. Brown CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(12):862-873.
110. Montoto S, Davies AJ, Matthews J, et al. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2007;25(17):2426-2433.
111. De Jong D, Voetdijk BM, Beverstock GC, van Ommen GJ, Willemze R, Kluin PM. Activation of the c-myc oncogene in a precursor-B-cell blast crisis of follicular lymphoma, presenting as composite lymphoma. *N Engl J Med.* 1988;318(21):1373-1378.
112. Gauwerky CE, Haluska FG, Tsujimoto Y, Nowell PC, Croce CM. Evolution of B-cell malignancy: pre-B-cell leukemia resulting from MYC activation in a B-cell neoplasm with a rearranged BCL2 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(22):8548-8552.
113. Hubbard SM, Chabner BA, DeVita VT, et al. Histologic progression in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1982;59(2):258-264.
114. Oviatt DL, Cousar JB, Collins RD, Flexner JM, Stein RS. Malignant lymphomas of follicular center cell origin in humans. V. Incidence, clinical

- features, and prognostic implications of transformation of small cleaved cell nodular lymphoma. *Cancer*. 1984;53(5):1109-1114.
115. Bastion Y, Sebban C, Berger F, et al. Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol*. 1997;15(4):1587-1594.
116. Lossos IS, Alizadeh AA, Diehn M, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large-cell lymphoma: alternative patterns with increased or decreased expression of c-myc and its regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(13):8886-8891.
117. Lossos IS, Levy R. Higher grade transformation of follicular lymphoma: phenotypic tumor progression associated with diverse genetic lesions. *Semin Cancer Biol*. 2003;13(3):191-202.
118. Martinez-Climent JA, Alizadeh AA, Segraves R, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations. *Blood*. 2003;101(8):3109-3117.
119. Davies AJ, Rosenwald A, Wright G, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma proceeds by distinct oncogenic mechanisms. *Br J Haematol*. 2007;136(2):286-293.
120. Maeshima AM, Omatsu M, Nomoto J, et al. Diffuse large B-cell lymphoma after transformation from low-grade follicular lymphoma: morphological, immunohistochemical, and FISH analyses. *Cancer Sci*. 2008;99(9):1760-1768.
121. Shiozawa E, Yamochi-Onizuka T, Yamochi T, et al. Disappearance of CD21-positive follicular dendritic cells preceding the transformation of follicular lymphoma: immunohistological study of the transformation using CD21, p53, Ki-67, and P-glycoprotein. *Pathol Res Pract*. 2003;199(5):293-302.
122. Yoon SO, Zhang X, Freedman AS, et al. Down-regulation of CD9 expression and its correlation to tumor progression in B lymphomas. *Am J Pathol*. 2010;177(1):377-386.
123. Lo Coco F, Gaidano G, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. p53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood*. 1993;82(8):2289-2295.
124. Elenitoba-Johnson KS, Gascoyne RD, Lim MS, Chhanabai M, Jaffe ES, Raffeld M. Homozygous deletions at chromosome 9p21 involving p16 and p15 are associated with histologic progression in follicle center lymphoma. *Blood*. 1998;91(12):4677-4685.
125. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. *Blood*. 2009;114(11):2273-2279.
126. Akasaka T, Lossos IS, Levy R. BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood*. 2003;102(4):1443-1448.
127. Cheung KJ, Shah SP, Steidl C, et al. Genome-wide profiling of follicular lymphoma by array comparative genomic hybridization reveals prognostically significant DNA copy number imbalances. *Blood*. 2009;113(1):137-148.
128. Do B, Lossos IS, Thorstenson Y, Oefner PJ, Levy R. Analysis of FAS (CD95) gene mutations in higher-grade transformation of follicle center lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2003;44(8):1317-1323.

129. Farinha P, Al-Tourah A, Gill K, Klasa R, Connors JM, Gascoyne RD. The architectural pattern of FOXP3-positive T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. *Blood*. 2010;115(2):289-295.
130. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(12):976-990.
131. Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell*. 2012;149(1):22-35.
132. Sander S, Calado DP, Srinivasan L, et al. Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis. *Cancer Cell*. 2012;22(2):167-179.
133. Janz S, Potter M, Rabkin CS. Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;36(3):211-223.
134. Ott G, Rosenwald A, Campo E. Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood*. 2013;122(24):3884-3891.
135. Karube K, Campo E. MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Hematol*. 2015;52(2):97-106.
136. Ouansafi I, He B, Fraser C, et al. Transformation of follicular lymphoma to plasmablastic lymphoma with c-myc gene rearrangement. *Am J Clin Pathol*. 2010;134(6):972-981.
137. Wang L, Aghel A, Peterson B, Wang-Rodriguez J, Wang HY, Zhao XF. Richter transformation with c-MYC overexpression: report of three cases. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(6):7540-7546.
138. Pan Z, Xie Q, Repertinger S, Richendollar BG, Chan WC, Huang Q. Plasmablastic transformation of low-grade CD5+ B-cell lymphoproliferative disorder with MYC gene rearrangements. *Hum Pathol*. 2013;44(10):2139-2148.
139. Au WY, Horsman DE, Gascoyne RD, Viswanatha DS, Klasa RJ, Connors JM. The spectrum of lymphoma with 8q24 aberrations: a clinical, pathological and cytogenetic study of 87 consecutive cases. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(3):519-528.
140. Huang W, Guo L, Liu H, Zheng B, Ying J, Lv N. C-MYC overexpression predicts aggressive transformation and a poor outcome in mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(9):5634-5644.
141. Delas A, Sophie D, Brousset P, Laurent C. Unusual concomitant rearrangements of Cyclin D1 and MYC genes in blastoid variant of mantle cell lymphoma: Case report and review of literature. *Pathol Res Pract*. 2013;209(2):115-119.
142. Geyer JT, Subramaniam S, Jiang Y, et al. Lymphoblastic transformation of follicular lymphoma: a clinicopathologic and molecular analysis of 7 patients. *Hum Pathol*. 2015;46(2):260-271.
143. Krysov S, Dias S, Paterson A, et al. Surface IgM stimulation induces MEK1/2-dependent MYC expression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2012;119(1):170-179.
144. Chisholm KM, Bangs CD, Bacchi CE, Molina-Kirsch H, Cherry A, Natkunam Y. Expression profiles of MYC protein and MYC gene rearrangement in lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(3):294-303.
145. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation,

- and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;117(2):563-574.
146. Gibson SE, Leeman-Neill RJ, Jain S, Piao W, Cieply KM, Swerdlow SH. Proliferation centres of chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma have enhanced expression of MYC protein, which does not result from rearrangement or gain of the MYC gene. *Br J Haematol*. 2015.
 147. Allman D, Punt JA, Izon DJ, Aster JC, Pear WS. An invitation to T and more: notch signaling in lymphopoiesis. *Cell*. 2002;109 Suppl:S1-11.
 148. Ferrando AA. The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:353-361.
 149. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2015;526(7574):519-524.
 150. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004;306(5694):269-271.
 151. Rosati E, Sabatini R, Rampino G, et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood*. 2009;113(4):856-865.
 152. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119(2):521-529.
 153. Oscier DG, Rose-Zerilli MJ, Winkelmann N, et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood*. 2013;121(3):468-475.
 154. Villamor N, Conde L, Martínez-Trillos A, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia*. 2013;27(5):1100-1106.
 155. Foo WC, Huang Q, Sebastian S, Hutchinson CB, Burchette J, Wang E. Concurrent classical Hodgkin lymphoma and plasmablastic lymphoma in a patient with chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma treated with fludarabine: a dimorphic presentation of iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorder with evidence suggestive of multiclonal transformability of B cells by Epstein-Barr virus. *Hum Pathol*. 2010;41(12):1802-1808.
 156. Pines A, Ben-Bassat I, Selzer G, Ramot B. Transformation of chronic lymphocytic leukemia to plasmacytoma. *Cancer*. 1984;54(9):1904-1907.
 157. Ramalingam P, Nayak-Kapoor A, Reid-Nicholson M, Jones-Crawford J, Ustun C. Plasmablastic lymphoma with small lymphocytic lymphoma: clinico-pathologic features, and review of the literature. *Leuk Lymphoma*. 2008;49(10):1999-2002.
 158. Robak T, Urbańska-Ryś H, Strzelecka B, et al. Plasmablastic lymphoma in a patient with chronic lymphocytic leukemia heavily pretreated with cladribine (2-CdA): an unusual variant of Richter's syndrome. *Eur J Haematol*. 2001;67(5-6):322-327.
 159. Valera A, Balagué O, Colomo L, et al. IG/MYC rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(11):1686-1694.
 160. Voorhees PM, Carder KA, Smith SV, Ayscue LH, Rao KW, Dunphy CH. Follicular lymphoma with a burkitt translocation--predictor of an aggressive clinical course: a case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med*. 2004;128(2):210-213.

161. Lossos IS, Gascoyne RD. Transformation of follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24(2):147-163.
162. Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2012;44(1):47-52.
163. Beà S, Valdés-Mas R, Navarro A, et al. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(45):18250-18255.
164. Guo Y, Karube K, Kawano R, et al. Low-grade follicular lymphoma with t(14;18) presents a homogeneous disease entity otherwise the rest comprises minor groups of heterogeneous disease entities with Bcl2 amplification, Bcl6 translocation or other gene aberrances. *Leukemia*. 2005;19(6):1058-1063.
165. Leich E, Salaverria I, Bea S, et al. Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood*. 2009;114(4):826-834.
166. Tagawa H, Karube K, Guo Y, et al. Trisomy 3 is a specific genomic aberration of t(14;18) negative follicular lymphoma. *Leukemia*. 2007;21(12):2549-2551.
167. Pillai S, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):767-777.
168. Simonetti G, Carette A, Silva K, et al. IRF4 controls the positioning of mature B cells in the lymphoid microenvironments by regulating NOTCH2 expression and activity. *J Exp Med*. 2013;210(13):2887-2902.
169. Witt CM, Won WJ, Hurez V, Klug CA. Notch2 haploinsufficiency results in diminished B1 B cells and a severe reduction in marginal zone B cells. *J Immunol*. 2003;171(6):2783-2788.
170. Real PJ, Tosello V, Palomero T, et al. Gamma-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*. 2009;15(1):50-58.
171. Tosello V, Ferrando AA. The NOTCH signaling pathway: role in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia and implication for therapy. *Ther Adv Hematol*. 2013;4(3):199-210.
172. Raess PW, Mintzer D, Husson M, et al. BRAF V600E is also seen in unclassifiable splenic B-cell lymphoma/leukemia, a potential mimic of hairy cell leukemia. *Blood*. 2013;122(17):3084-3085.
173. Hockley SL, Else M, Morilla A, et al. The prognostic impact of clinical and molecular features in hairy cell leukaemia variant and splenic marginal zone lymphoma. *Br J Haematol*. 2012;158(3):347-354.
174. Matutes E, Oscier D, Montalban C, et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia*. 2008;22(3):487-495.